

**Einfluß der Auftaugeschwindigkeit auf die Motilität
von Kryosperma**

Andreas Rübekeil

*Diss
dfinieren
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco

Einfluß der Auftaugeschwindigkeit auf die Motilität
von Kryosperma

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Rübekeil
aus München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W.-B. Schill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr.h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 1985

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	Seite 1
2.	<u>Material und Methoden</u>	6
2.1.	Humansperma	6
2.2.	Spermatozoenmotilität	6
2.2.1.	Zählkammer nach Makler	6
2.2.2.	Multiple-Exposure-Photographie	7
2.2.3.	Motilität in Prozent	7
2.2.4.	Progressivgeschwindigkeit	8
2.3.	Gefrierverfahren	8
2.4.	Auftauverfahren	9
2.5.	Statistische Auswertung	11
2.6.	Versuchsanordnung	11
3.	<u>Ergebnisse</u>	13
3.1.	Auswahl geeigneter Auftautemperaturen und -zeiten	13
3.2.	Vergleich der geschätzten Motilität mit der Mo- tilität nach MEP	16
3.3.	Einfluß des kryoprotektiven Mediums auf Motilität und Geschwindigkeit	16

3.4.	Einfluß der Auftaugeschwindigkeit auf Motilität und Geschwindigkeit	Seite 18
3.4.1.	Absolute Werte	18
3.4.2.	Prozentuale Veränderungen	23
3.4.3.	Vergleich zwischen Nativ- und Kryosperma	28
4.	<u>Diskussion</u>	29
5.	<u>Zusammenfassung</u>	49
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	50

Lebenslauf

1. Einleitung

Die Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen zum Zweck der künstlichen Insemination führte bis 1979 weltweit zu schätzungsweise über 5000 (67), mittlerweile sicherlich zu einer weit größeren Zahl von Geburten. Die erzielte Konzeptionsrate beträgt bis zu 92,2 % nach elf Monaten Behandlung (21), bei den meisten Autoren jedenfalls über 50 % nach zwölf Zyklen (22, 28, 41).

Neben der Konzeptionsrate als optimaler, aber nur sehr langfristig möglicher Qualitätskontrolle für Kryosperma sind der Motilität der Spermatozoen und der Progression der motilen Spermatozoen nach dem Tiefgefrier-Auftauvorgang große Bedeutung beizumessen. Besonders letztere wird gerade bei geringer Spermatozoendichte zum limitierenden Faktor (56). Die Überlebensrate der Spermatozoen liegt nach dem Auftauen zwischen 45 und 95 % mit einem Durchschnittswert von 70 % (8, 44).

Bei bisherigen Optimierungsversuchen in der Kryokonservierung wurde vor allem dem Gefriervorgang mit seinen zeitlichen Variationsmöglichkeiten für die einzelnen Temperaturbereiche und den dabei auftretenden Phänomenen Kälteschock, Dehydration, Kristallisation und Rekristallisation einerseits und den kryoprotektiven Substanzen wie Glycerin und DMSO andererseits größte Bedeutung zugeschrieben. Dem Erwärmungs- und Auftauprozess wurde hingegen, zumindest was Humansperma betrifft, weit weniger Aufmerksamkeit zuteil. Der nach dem Tiefgefrieren einsetzende Auftauvorgang sei für die Spermaqualität von geringem Einfluß (53).

Die darüber in der Literatur gemachten Angaben widersprechen sich zudem. Die Mehrzahl der Autoren empfiehlt langsame Erwärmungsraten. Nach Sawada (53) ist Auftauen in einem Wasserbad von 5°C oder in Luft bei Zimmertemperatur dem in einem Wasserbad von 37°C überlegen. Matheson (37) zeigte, daß Zimmertemperatur besser ist als Wasserbäder von 4°C oder 37°C .

Trounson (73) erzielte maximale Überlebensraten, wenn die Pailletten auf einem Arbeitstisch bei 20°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) auftauten, was einer Geschwindigkeit von $43,5$ ($\pm 4,3$) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entspricht. In den neueren Arbeiten über Kryosperma wird meist in Luft bei Zimmertemperatur ($17, 25, 28, 62$) oder im Wasserbad bei $20 - 24^{\circ}\text{C}$ (60) oder 37°C (26) aufgetaut. Andere Autoren (63, 64, 72) empfahlen dagegen höhere Auftaugeschwindigkeiten, allerdings nicht über 40°C im Wasserbad hinausgehend. Diese Ergebnisse lassen sich wegen der Verschiedenheit der angewandten Gefrierverfahren und der unterschiedlichen Menge zugesetzter kryoprotektiver Substanzen nur schwer miteinander vergleichen und wegen der zumeist verwendeten Glasampullen als Verpackungsmittel kaum auf das heute am meisten verbreitete Verfahren mit Plastikpailletten übertragen.

In der allgemeinen kryobiologischen Literatur finden sich einige Stellen über die Bedeutung hoher Auftaugeschwindigkeiten für die Vitalität verschiedener Zellen und Gewebe. In Gegenwart von 10 oder 15 % DMSO langsam eingefrorenes Knochenmark soll im Wasserbad von 40°C aufgetaut werden (6). Für mit 15 % Glycerin langsam gefrorene Haut stellt schnelles Erwärmen die beste Technik dar (40). Ohne Zusatz von Glycerin läßt sich Kaninchenhaut vom Ohr

erfolgreich nur nach schnellem Tauen bei 37°C transplantieren, mit 15 % Glycerin auch nach langsamerem Erwärmen (31). Bei Hefen verhält sich die Überlebensrate mit Glycerin proportional zur Auftaugeschwindigkeit, wenn die Gefriereschwindigkeit $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ überstiegen hatte (31). Schnelles Frieren und Tauen fördern das Überleben von Protozoen (Plasmodien) ohne protektive Substanzen (31). Tödliche Schäden können bei Nematoden (Fadenwürmer) verringert werden, wenn sie in 70°C heißem Wasser innerhalb weniger Sekunden getaut werden, ebenso wie bei einer bestimmten Raupenart (31). Langsames Erwärmen nach gefrorenem Zustand ist für Zellen und Organe von Wirbeltieren gefährlich (31). Im großen und ganzen ist schnelles Tauen erfolgreicher als langsames (55). Diese bunte Liste ließe sich fortsetzen. Die Begriffe "langsam" und "schnell" können hier nur relativer Natur sein, da die Geschwindigkeit und das Ausmaß der bei den Temperaturveränderungen ablaufenden Vorgänge von den Eigenschaften der jeweiligen Zellen und Gewebe, besonders der Permeabilität der Zellwand für Wasser und dem Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen, abhängen (38).

Aus der Veterinärmedizin wiederum liegen zahlreiche Berichte über günstige Auswirkungen hoher Auftaugeschwindigkeiten bezüglich der Schädigung des Akrosoms, der Motilität und auch der Fertilitätsrate vor. Die meisten Untersuchungen befassen sich mit Bullensperma, Ausgangstemperatur ist in allen Fällen -196°C .

Robbins et al. (49) zeigten, daß als Auftaumedium $35 - 75^{\circ}\text{C}$ warme Wasserbäder solchen von $5 - 20^{\circ}\text{C}$ hinsichtlich des Prozentsatzes der Spermatozoen mit intaktem Akrosom (percentage of intact

acrosome = PIA) und der Motilitätsrate überlegen sind.

Almquist et al. (4) stellten dar, daß 75°C eine bessere Motilität bewirken als 35°C und diese eine bessere als 5°C , jedoch 95°C das Ergebnis von 75°C nicht weiter verbessern. Wiggin et al. (76) zeigten, daß 75°C optimal sind. Rodriguez et al. (51) bestätigten diese Ergebnisse, indem sie die Plastikpailletten mit dem Resultat steigender Motilität für 3 min in 5°C , 12 sec in 35°C und 8 sec in 55°C erwärmten, jedoch bei 7 sec in 75°C und 5 sec in 90°C keine weitere Verbesserung erzielten. Robbins et al. (50) wiesen einen engen Zusammenhang zwischen Glycingehalt im Verdünnungsmedium und optimaler Erwärmungsgeschwindigkeit nach, wobei jedoch beide Parameter auch unabhängig voneinander signifikanten Einfluß auf die Motilität haben. Als optimale Konstellation für PIA und Motilität nennen sie 7,5 sec in Wasser von 65°C und 8,5 % Glycerin. Nach Senger et al. (61) erhöht langsames Auftauen im Wasserbad von unter 35°C (Dauer 1 min) die Wahrscheinlichkeit, daß durch plötzliches weiteres Erwärmen, z.B. auf 37°C , Schäden entstehen. Erneute Bestätigung hoher Erwärmungsraten lieferten De Abreu et al. (14), wonach Auftauen bei 5°C (2 min) schlechtere Ergebnisse (PIA und Motilität) zur Folge hat als bei 35°C (12 sec) und Auftauen bei 75°C (6 sec) bei gleichbleibender Motilität für PIA eine nochmalige Steigerung bewirkt.

Einen anderen Aspekt beleuchteten Almquist et al. (5) und Brown et al. (11) mit der Feststellung, daß Kryosperma nicht nur schnell, sondern im selben Vorgang auch bis zum Erreichen einer wesentlich über 5°C liegenden, der physiologischen Kör-

perwärme nahen Temperatur erwärmt werden müsse. Almquist erzielte auf diese Weise eine signifikant erhöhte Fertilitätsrate.

Schließlich sei noch erwähnt, daß auch für Kryosperma vom Schafbock schnelle Auftauraten (15 sec in 40°C oder 10 sec in 50°C oder 5 sec in 60°C) die geringsten Motilitätsverluste nach sich ziehen (75).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit Hilfe einer objektiven Methode zu prüfen, ob auch bei menschlichem Kryosperma hohe Auftaugeschwindigkeiten eine Verbesserung der Motilität der Spermatozoen bewirken.

2. Material und Methoden

2.1. Humansperma

Die Untersuchungen wurden mit 9 frisch gewonnenen Ejakulaten (1 Stunde nach Masturbation) durchgeführt, deren Spermatozoendichte 28,0 - 118,6 Mill./ml (Durchschnitt 62,7 Mill./ml) betrug. Es wurde darauf geachtet, daß die Ejakulate keine Agglomerations- oder Agglutinationsphänomene aufwiesen.

Die Gesamtmotilität der Ejakulate lag zwischen 50 und 70 % (Durchschnitt 62,2 %), die Progressivmotilität zwischen 30 und 45 % (Durchschnitt 36,7 %).

2.2. Spermatozoenmotilität

2.2.1. Zählkammer nach Makler

Sämtliche Motilitätsbestimmungen wurden in der von Makler entwickelten Zählkammer (34, 35) durchgeführt.*

Diese hat eine Tiefe von exakt 10 μ m, was die Fokussierung der Spermatozoen erleichtert und verhindert, daß sich die Spermatozoen in mehreren Schichten übereinander bewegen können. In das Deckglas ist ein 1 mm² großes Gitter gezeichnet, unterteilt in 100 0,1 x 0,1 mm große Quadrate. Unterhalb des Gitters befindet sich somit eine Flüssigkeitsmenge von 10⁻⁵ ml.

* Israel Electro-Optical Industry LTD.

Rehovot, Israel

2.2.2. Multiple-Exposure-Photographie

Das Verfahren der Multiple-Exposure-Photographie (MEP) nach Makler (33, 36) ermöglicht eine objektive Ermittlung der Motilitätsrate und der Progressivgeschwindigkeit von Spermatozoen. Mit Hilfe eines mechanischen Stroboskops werden die unter einem Phasenkontrastmikroskop befindlichen Proben so photographiert, daß jede Aufnahme während einer Gesamtdauer von 1 sec sechsmal für jeweils ca. 0,005 sec belichtet wird. Dazu schiebt man eine Scheibe mit sechs schmalen radiär angeordneten Schlitzen in den Strahlengang des Mikroskops, die sich einmal während einer Sekunde dreht. In der photographischen Dokumentation sieht man dann ein motiles Spermatozoon im Idealfall als sechsgliedrige perlschnurartige Kette abgebildet, während eine unbewegliche Samenzelle sechsmal heller und nur an einer Stelle zu sehen ist (siehe Photographie dritte Umschlagseite).

Um statistisch ausreichend gesicherte Daten zu bekommen, wurden von jeder Probe vier Aufnahmen in verschiedenen Feldern angefertigt, mindestens jedoch soviel, daß 300 Spermatozoen pro Probe analysiert werden konnten (33). Die Negative der Schwarzweißphotographien* wurden dann mit Hilfe eines Diabetrachters** ausgewertet.

2.2.3. Motilität in Prozent

Der Prozentsatz der Gesamtzahl der beweglichen Spermatozoen wurde nach dem Auszählen folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Mot.} = \frac{\text{Zahl der motilen Spermatozoen} \times 100}{\text{Gesamtzahl der Spermatozoen}}$$

* Agfapan Professional 100 (21 DIN = ASA 100)

** Osram Diastar 200, Osram GmbH, München

2.2.4. Progressivgeschwindigkeit

Zur Ermittlung der Progressivgeschwindigkeit wurden die Spuren der sich vorwärts bewegenden Spermatozoen durch Projektion des Negativbildes auf eine durchsichtige Plastikfolie übertragen. Der Abstand von Endpunkt zu Endpunkt der nun entstandenen Linien wurde gemessen. Daraus läßt sich die durchschnittliche Geschwindigkeit wie folgt errechnen:

$$\bar{V} = \frac{T \cdot x \cdot S}{N \cdot x \cdot (P - 1)}$$

$\bar{V}$ = Durchschnittsgeschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{sec}$

T = Gesamtlänge der vermessenen Spuren umgerechnet in μm
(Anhand des in 2.2.1. beschriebenen Gitters läßt sich der Vergrößerungsfaktor leicht ermitteln.)

S = Anzahl der Schlitze in der Stroboskopscheibe oder Lichtimpulse/sec

N = Anzahl der pro Probe vermessenen Spuren

P = Anzahl der in der Kette des sich am schnellsten bewegenden Spermatozoons zu sehenden Köpfchen

2.3. Gefrierverfahren

Zur Herstellung von Kryosperma wurden Ejakulat und kryoprotektives Medium (beide 37°C) nach Verflüssigung im Verhältnis 2:1 gemischt.

Zusammensetzung des kryoprotektiven Mediums (Verdünner):

Na-Citrat	1,0 g
Fructose	2,5 g
Glycerin	21,0 ml

Eidotter	30,0 ml
Streptomycin	0,6 g
Aqua bidest.	ad 100,0 ml

Das verdünnte Ejakulat wurde in 0,25 ml-Pailletten* gefüllt, diese mit Glaskugeln verschlossen und in Kassetten à 6 Pailletten eingelegt. Die Pailletten wurden dann bei 4°C für 15 min gelagert und anschließend im Stickstoffdampf in vertikaler Lage (unteres Ende ca. 6 cm über dem Flüssigkeitsspiegel) für 60 min aufbewahrt. Schließlich erfolgte die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.4. Auftauverfahren

Nach einer Aufbewahrungszeit von minimal 14 Tagen und maximal 73 Tagen (Durchschnitt 49,1 Tage) wurden die tiefgefrorenen Samenportionen unmittelbar nach der Entnahme aus flüssigem Stickstoff in einem Auftauautomaten** (siehe Abb. 1) erwärmt. Dieser arbeitet mit einem Warmwasserbad, aus dem die Pailletten anschließend durch einen automatischen Lift herausgehoben werden. Der Lift besteht aus einem schwimmenden Auftaukäfig, welcher mit einem Elektromagnet während des Auftauvorganges am Boden des Wasserbades festgehalten wird. Die elektronische Steuerung des Automaten ermöglicht eine Programmvorwahl für Wassertemperatur (0 - 70°C mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) und Auftauzeit (0 - 29 sec).

* Minitüb GmbH Abfüll- und Labortechnik, D - 8300 Landshut

** Auftau-Automat Minitüb MTA 70, Minitüb GmbH Abfüll- und Labortechnik, D - 8300 Landshut

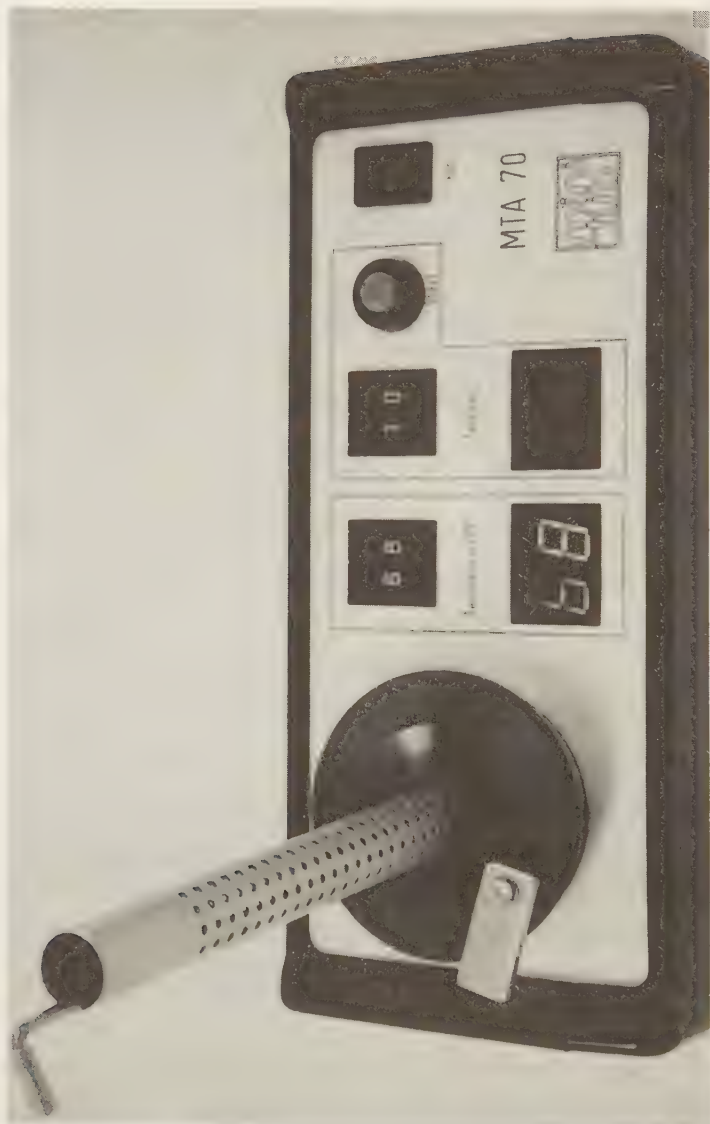


Abb. 1 : Aufstaunautomat

Die unmittelbar nach dem Erwärmungsvorgang in der Paillette erreichten Temperaturen wurden mit einem elektronischen Temperaturreßgerät* ermittelt.

Die aufgetauten Ejakulate wurden danach in vorgewärmten Gefäßen bei 37°C gelagert.

2.5. Statistische Auswertung

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem t-Test für verbundene Stichproben. Die mathematischen Berechnungen von Mittelwerten, Standardabweichungen und mittleren Fehlern der Mittelwerte wurden mit dem Rechner Casio College fx - 100, Casio Computer Co., LTD., durchgeführt.

2.6. Versuchsanordnung

Zunächst wurden die nach Ende des Erwärmungsvorganges im Ejakulat herrschenden Temperaturen bei verschiedenen Auftautemperaturen und -zeiten ermittelt. Dies geschah mit beliebigem Humansperma.

Die Motilitätsbestimmung wurde mit Nativsperma vor dem Zusetzen von Verdünner, mit verdünntem Sperma ca. 5 - 10 min danach und mit Kryosperma jeweils unmittelbar und 20 min nach dem Auftauen durchgeführt. Sämtliche Motilitätsbestimmungen fanden bei 37°C statt.

* Gulton Tastotherm D 1200

Jedes Ejakulat wurde sechs verschiedenen Auftaugeschwindigkeiten unterzogen, wobei die jeweilige Dauer der Wärmeexposition so gewählt wurde, daß vergleichbare Endtemperaturen erreicht wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Auswahl geeigneter Auftautemperaturen und -zeiten

Bei einer Unzahl möglicher Kombinationen von Temperaturen im Wasserbad und Auftauzeiten einerseits und bei den nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung stehenden Probenmengen pro Ejakulat andererseits wurde es vor den eigentlichen Versuchsreihen unumgänglich, eine bestimmte Anzahl solcher Kombinationen sinnvoll auszuwählen.

Als geeignete Wasserbadtemperaturen wurden 37°C , 40°C , 45°C , 50°C , 60°C und 70°C vorausgesetzt. Um nun die verschiedenen Erwärmungsgeschwindigkeiten miteinander vergleichbar zu machen, mußten bei diesen Temperaturen jeweils diejenigen Erwärmungszeiten ermittelt werden, nach welchen in den Pailletten jeweils annähernd gleiche Temperaturen zu finden sind. Als Ziel wurde eine Endtemperatur knapp unter 30°C festgelegt.

Es wurden für die Untersuchungen die in Tabelle 1 und Abbildung 2 ersichtlichen Auftaubedingungen ermittelt. Die Endtemperatur beträgt durchschnittlich $27,7^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2,9^{\circ}\text{C}$).

Zusätzlich wurden bei 60°C und 70°C Wassertemperatur Messungen mit längerer Auftauzeit durchgeführt (siehe Tabelle 2). Dabei zeigt sich, daß ein Spielraum bis zu einer Überwärmung des Ejakulats von jeweils 3 - 4 sec gegeben ist. Ferner ist zu sehen, daß, auch wenn man vom eigentlichen Auftauvorgang absieht, die Erwärmung keineswegs linear vor sich geht, sondern langsamer abläuft, wenn sich die Temperatur in der Paillette der des Wasserbades nähert.

Auftautemp.(°C)	Auftauzeit(sec)	Endtemp.(°C)	Geschw.(°C/sec)
37	20	30,6	11,3
40	17	28,4	13,2
45	14	27,7	16,0
50	11	25,0	20,1
60	9	26,6	24,7
70	7	28,0	32,0

Tab.1: Auftaubedingungen bei den Versuchen

Auftautemp.(°C)	Auftauzeit(sec)	Endtemp.(°C)
60	9	26,6
60	12	34,4
60	13	36,5
60	14	38,6
60	15	40,5
70	7	28,0
70	10	34,4
70	13	40,8

Tab.2: Temperaturen im Ejakulat nach verlängerten Auftauzeiten

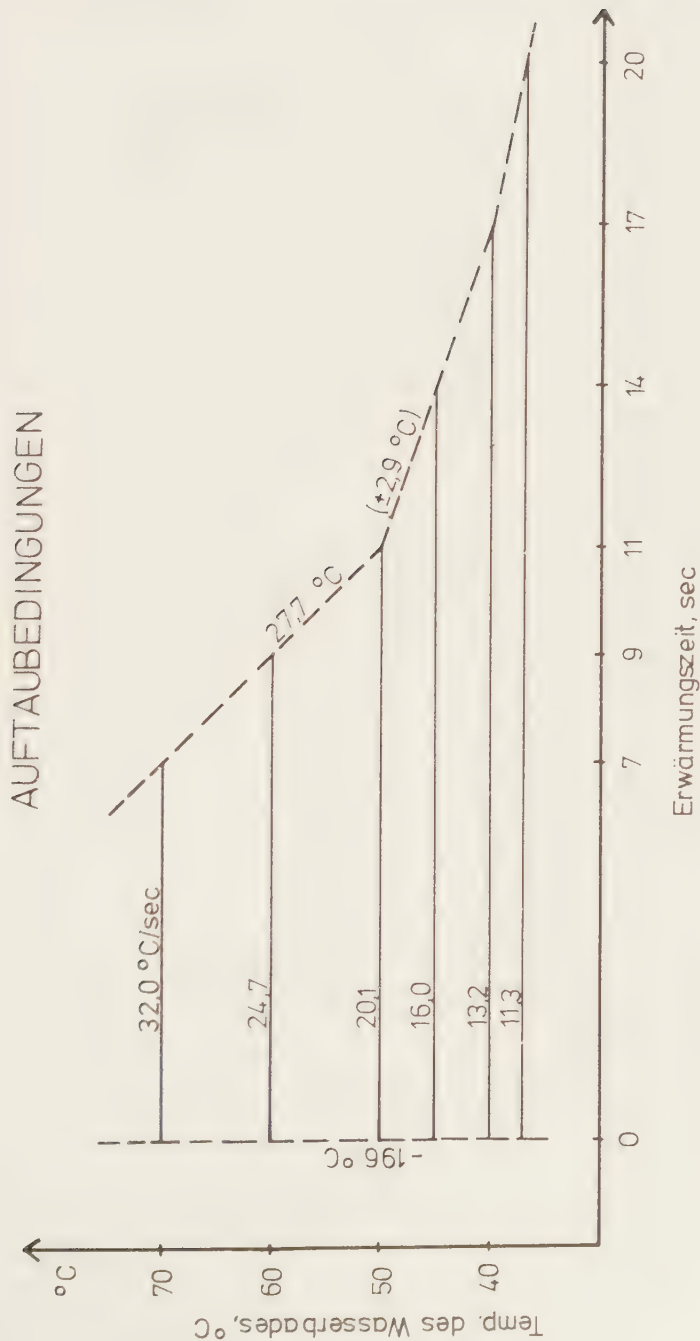


Abb.2: Auftaubedingungen bei den Versuchen

3.2. Vergleich der geschätzten Motilität mit der Motilität nach MEP

Vergleicht man bei Nativsperma die mit der herkömmlichen Schätzmethode ermittelte Motilität mit der nach der MEP-Methode in nur wenigen Minuten Abstand festgestellten Motilität, so ergeben sich bei letzterer Methode durchweg geringere Motilitäten (siehe Tabelle 3).

Der Unterschied ist statistisch signifikant ($2p < 0,01$). Die subjektive Methode liefert hier also ein durchschnittlich um circa 17 Prozentpunkte oder circa 38 % zu hoch liegendes Ergebnis.

n = 8	Schätzmethode	MEP
Motilität $\bar{x}$	61,3 %	44,3 %
Standardabw.	$\pm 8,3$	$\pm 9,8$
SEM	$\pm 3,0$	$\pm 3,5$

Tab.3: Vergleich subjektiver und objektiver
Motilitätsbestimmung
(SEM = Standardfehler des Mittelwerts)

3.3. Einfluß des kryoprotektiven Mediums auf Motilität und Geschwindigkeit

Die Wirkung des Verdünnungsmediums auf die Spermatozoen wird in Tabelle 4 dargestellt (siehe auch Abbildungen 3 und 4).

Bezüglich der Globalmotilität ergibt sich bei 6 von 8 Ejakulaten eine Steigerung von durchschnittlich 45,3 % auf 51,6 %.

Die Motilität zweier Ejakulate verschlechterte sich (von 37,2 % auf 30,7 % bzw. von 45,5 % auf 10,6 %). Das außerordentlich starke Absinken im letztgenannten Fall ist ungewöhnlich, da das gleiche Ejakulat nach dem Auftauen wieder eine höhere Motilität aufwies. In Tabelle 5 sind daher die Mittelwerte ohne Berücksichtigung dieses besonderen Falles angegeben.

Die Progressivgeschwindigkeit der Spermatozoen stieg - abgesehen von 2 Fällen mit leichter Verschlechterung - bei allen Spermproben nach Zusatz des Kryoprotektivums an. Beide Qualitäten der Spermatozoenmotilität verschlechterten sich in keinem Fall gleichzeitig. Die beobachteten Motilitäts- und Geschwindigkeitsveränderungen lagen außerhalb der statistischen Signifikanz.

n = 3	nativ	verdünnt
Motilität $\bar{x}$	44,3 %	44,1 %
Standardabw.	$\pm 9,8$	$\pm 18,4$
SEM	$\pm 3,5$	$\pm 6,5$
Geschw. $\bar{x}$	41,0 $\mu\text{m}/\text{sec}$	43,2 $\mu\text{m}/\text{sec}$
Standardabw.	$\pm 7,3$	$\pm 6,0$
SEM	$\pm 2,6$	$\pm 2,1$

Tab.4: Motilität und Geschwindigkeit nach Zusatz des Kryoprotektivums

n = 7	nativ	verdünnt
Motilität $\bar{x}$	44,1 %	48,9 %
Standardabw.	$\pm 10,5$	$\pm 13,5$
SEM	$\pm 4,0$	$\pm 5,1$

Tab.5: Motilität nach Zusatz des Kryoprotektivums (n = 7)

3.4. Einfluß der Auftaugeschwindigkeit auf Motilität und Geschwindigkeit

3.4.1. Absolute Werte

Das Hauptgewicht der vorliegenden Arbeit lag auf der Ermittlung des Einflusses verschiedener Auftaugeschwindigkeiten auf die Qualität von Kryosperma. Dazu wurden bei 9 Ejakulaten unter den in 3.1. angegebenen Bedingungen Motilitätsmessungen durchgeführt. Als Kontrollwerte dienen die bei einer Auftaugeschwindigkeit von $11,3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ (20 sec in 37°C) erhaltenen Ergebnisse, da diese der in der andrologischen Praxis zumeist angewandten Auftaumethode entspricht.

Tabelle 6 und Abbildung 3 zeigen die durchschnittliche Globalmotilität bei den einzelnen Versuchsreihen. Es ergeben sich im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikanten Verbesserungen oder Verschlechterungen. Die Sofortwerte bieten, wohl wegen eines noch nicht eingestellten Gleichgewichts im Stoffwechsel der Spermatozoen, ein wesentlich bunteres Bild als die 20 min nach dem Auftauen gemessenen Werte. Letztere erreichen bei insgesamt leicht ansteigender Tendenz ein sich bis $24,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (9 sec in 60°C) erstreckendes Plateau. Die erhaltenen großen statistischen Schwankungsbreiten (große Standardabweichungen) ergeben sich infolge der Verwendung von Absolutzahlen bei verschiedener Qualität der Ejakulate. Dazu kommen die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Ejakulate auf die jeweilige Auftaubedingung. So weisen nach 20 min zwei Proben beim Kontrollwert, zwei bei $13,2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, je eine bei $16,0^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ und $20,1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ und zwei bei $24,7^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ die größte Motilität auf.

n = 9	Motilität in %		Geschw. (µm/sec)	
	sofort	20 min	sofort	20 min
20 sec in 37°C $\bar{x}$	22,3	18,8	38,7	36,4
Standardabw.	± 11,6	± 12,8	± 4,9	± 7,1
SEM	± 3,9	± 4,3	± 1,6	± 2,4
17 sec in 40°C $\bar{x}$	18,6	18,6	41,0	37,4
Standardabw.	± 12,3	± 13,8	± 5,4	± 8,5
SEM	± 4,1	± 4,6	± 1,8	± 2,6
14 sec in 45°C $\bar{x}$	24,7	19,2	41,4	38,4
Standardabw.	± 15,3	± 13,9	± 4,7	± 7,0
SEM	± 5,1	± 4,6	± 1,6	± 2,3
11 sec in 50°C $\bar{x}$	24,6	20,0	42,4	39,5
Standardabw.	± 13,6	± 13,5	± 4,3	± 6,6
SEM	± 4,6	± 4,5	± 1,4	± 2,2
9 sec in 60°C $\bar{x}$	19,5	19,9	41,9	41,2
Standardabw.	± 9,8	± 11,4	± 5,8	± 6,8
SEM	± 3,3	± 3,8	± 2,0	± 2,3
7 sec in 70°C $\bar{x}$	26,3	18,3	42,1	37,6
Standardabw.	± 14,1	± 11,2	± 5,2	± 6,2
SEM	± 5,0	± 4,0	± 1,9	± 2,2

Tab.6: Globalmotilitäten und Progressivgeschwindigkeiten bei verschiedenen Auftaugeschwindigkeiten

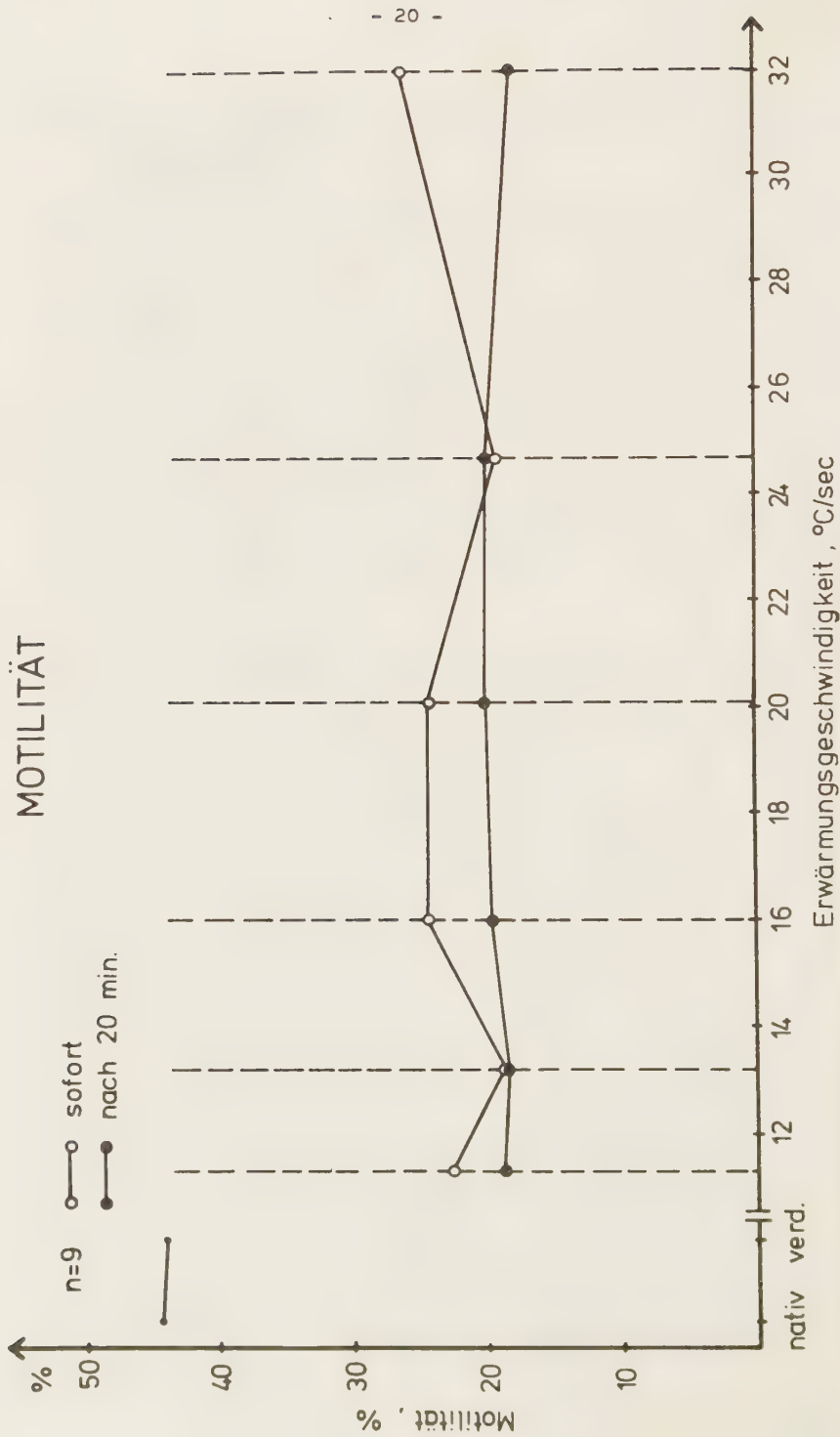


Abb. 3: Globalmotilität bei verschiedenen Aufwärmgeschwindigkeiten

Das Verhalten der mittleren Progressivgeschwindigkeit unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wird ebenfalls aus Tab.6 und Abb.4 ersichtlich. Es fällt der kontinuierliche Anstieg der Spermatozoengeschwindigkeit mit schnellerem Tauen auf, der bei sofortiger Messung einen Gipfel bei $20,1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ (11 sec in 50°C) erreicht. Dieser Höchstwert fällt bei noch höherer Auftaurate nur leicht ab. Nach 20 min zeigt sich ein besonders gleichmäßiger Anstieg zum Höchstwert bei $24,7^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ (9 sec in 60°C) und ein Abfall bei $32,0^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ (7 sec in 70°C). Diese Steigerung bei einer Auftaugeschwindigkeit von $24,7^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ im Vergleich zum Kontrollwert ist statistisch signifikant ($2 p < 0,005$). Im Gegensatz dazu ist die geringere Verbesserung der Progressivmotilität in den übrigen Gruppen mit unterschiedlichen Erwärmungsraten statistisch nicht signifikant. Auch die Ergebnisse bei Betrachtung der Einzelejakulate ergeben im Vergleich zur Globalmotilität ein gleichmäßigeres Bild, was sich in den kleineren Standardabweichungen widerspiegelt. Von 9 untersuchten Ejakulaten zeigen nach 20 min je eines bei $13,2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, $16,0^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ und $20,1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, vier bei $24,7^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ und zwei bei $32,0^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ die höchste Progressivmotilität. Bei den unmittelbar nach dem Auftauen gewonnenen Werten verschiebt sich diese Verteilung geringgradig in Richtung der niedrigeren Auftaugeschwindigkeiten.

Wie zu erwarten liegen sowohl hinsichtlich der Globalmotilität als auch der Progressivgeschwindigkeit die 20-Min.-Werte fast generell niedriger als die Sofortwerte, bei der Globalmotilität im Schnitt um 14,1 % (Streubreite +2,1 bis -30,3 %) bei der Geschwindigkeit im Schnitt um 6,85 % (Streubreite -1,6 bis -10,8 %).

PROGRESSIVGESCHWINDIGKEIT

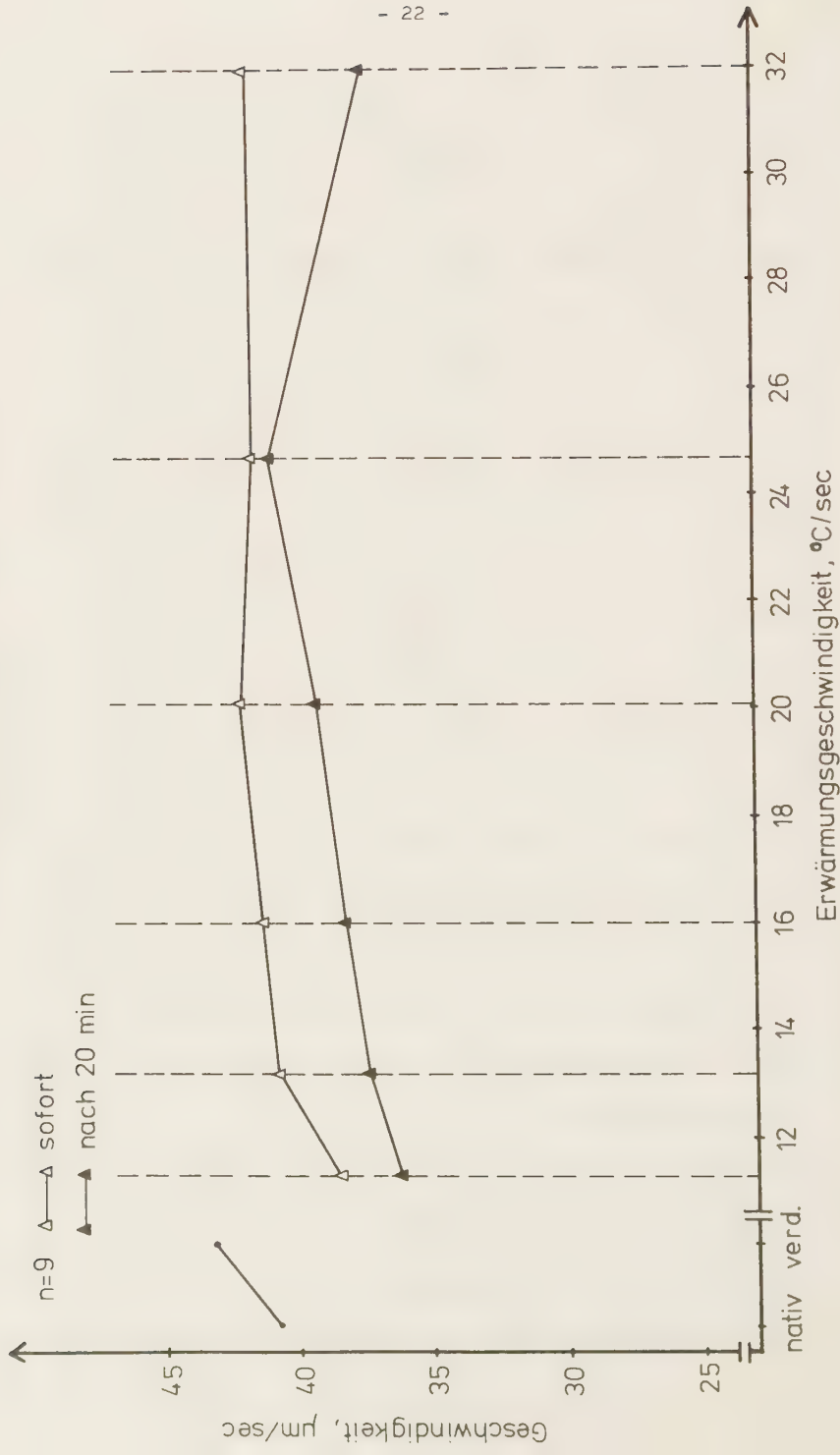


Abb. 4: Progressivgeschwindigkeit bei verschiedenen Aufwärmgeschwindigkeiten

3.4.2. Prozentuale Veränderungen

Bezieht man die Meßwerte der Spermatozoenmotilität und -geschwindigkeit auf die Kontrollwerte, so erhält man die prozentualen Veränderungen (relative Werte), die in Tabelle 7 und Abbildung 5 (nur 20-Min.-Werte) wiedergegeben sind. Dies geschieht nach der Formel 1

$$100 \left(\frac{\sum x_2}{n} - \frac{\sum x_1}{n} \right) \cdot \frac{\sum x_1}{n}$$

Logischerweise entspricht dieser Kurvenverlauf in seinen Veränderungen dem Verlauf der absoluten Werte, der Kurvenverlauf wird jedoch deutlicher sichtbar gemacht.

n = 9	Motilität		Geschwindigkeit	
	sofort	20 min	sofort	20 min
20 sec in 37°C d in %	± 0	± 0	± 0	± 0
17 sec in 40°C d in %	-12,2	- 1,1	+ 6,0	+ 2,8
14 sec in 45°C d in %	+ 2,4	+ 5,5	+ 6,3	+ 5,5
11 sec in 50°C d in %	+ 2,1	+ 6,6	+ 9,6	+ 2,5
9 sec in 60°C d in %	-14,3	+ 6,2	+ 8,4	+13,3
7 sec in 70°C d in %	+15,5	- 2,4	+ 9,0	+ 3,1

Tab.7: Prozentuale Veränderungen der Durchschnittswerte
(d = Meßwert minus Kontrollwert)

RELATIVE 20-MIN.-WERTE I

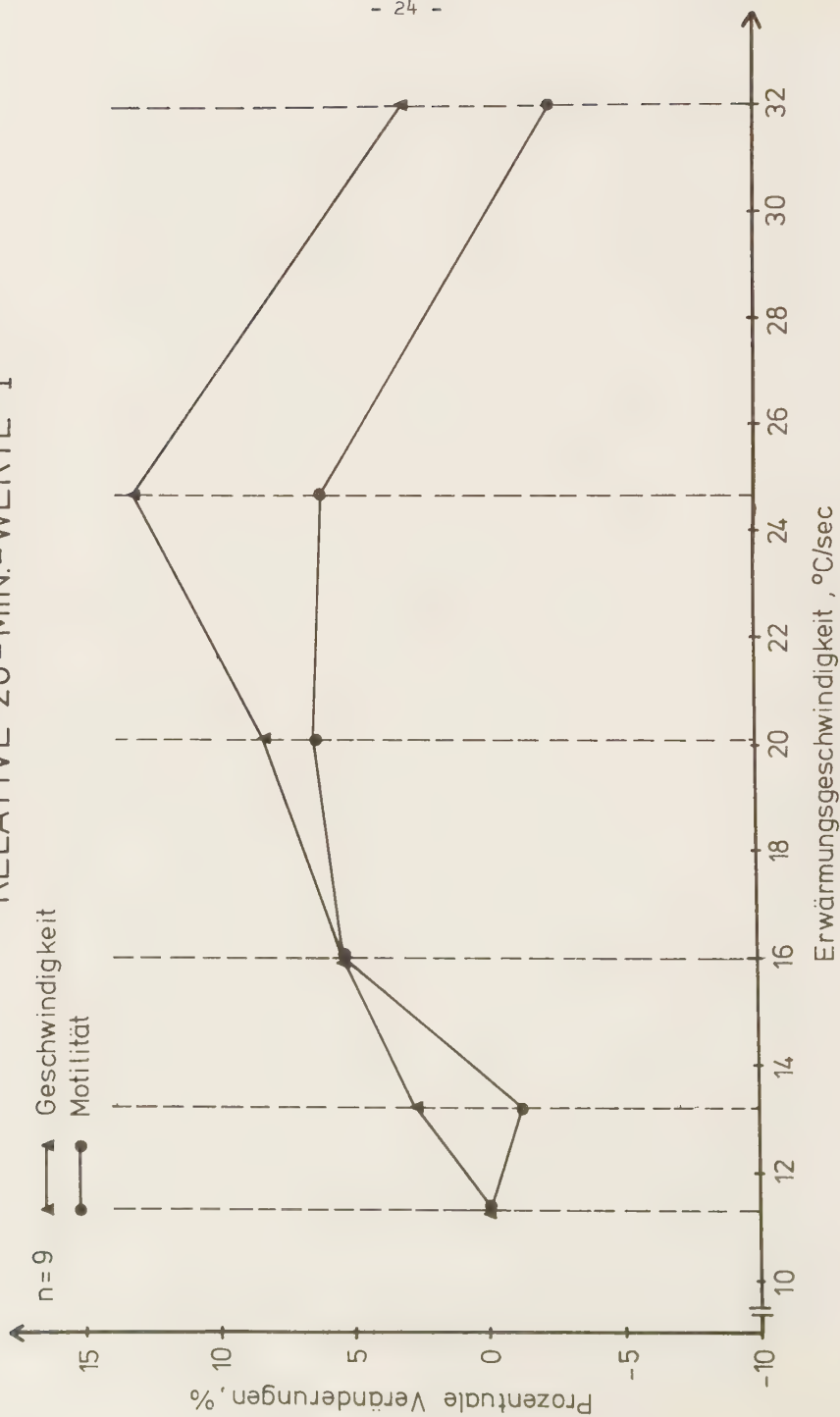


Abb.5: Prozentuale Veränderung der Durchschnittswerte

Errechnet man dagegen den Durchschnitt der prozentualen Einzelabweichungen vom Kontrollwert nach der Formel 2

$$\frac{\sum \frac{100 (x_2 - x_1)}{x_1}}{n} ,$$

so erhält man Ergebnisse, deren Verlauf vom bisher beschriebenen abweicht (siehe Tabelle 8 und Abbildung 6).

Die Sofortwerte sind sämtlich leicht nach oben verschoben, bei der Motilität um maximal 10,0 Prozentpunkte von 15,5 % auf 25,5 % bei 32,0°C/sec, bei der Progressivgeschwindigkeit um maximal 2,6 Prozentpunkte von 9,0 % auf 11,6 % ebenfalls bei 32,0°C/sec. Insgesamt verhalten sich die Kurvenverläufe jedoch vergleichbar. Bei den 20-Min.-Werten gilt Gesagtes für die Progressivgeschwindigkeit, wo die leicht nach oben versetzte Kurve den bisherigen Verlauf beibehält, nur bei 13,2°C/sec minimal (0,4 Prozentpunkte) darunter liegt. Die maximale Verschiebung nach oben liegt bei 20,1°C/sec mit 1,3 Prozentpunkten. Anders verhält es sich hingegen bei der Globalmotilität. Die dafür ermittelte Kurve zeigt mit 20,0 % bei 24,7°C/sec (9 sec in 60°C) einen neuen Gipfel, steigt bis dahin kontinuierlich an, fällt danach wieder ab und gleicht damit den für die Progressivgeschwindigkeiten erhaltenen Verläufen. Dabei erreicht sie um vieles höhere Prozentzahlen als die nach Formel 1 errechnete Kurve (maximal 13,8 Prozentpunkte mehr bei der zweit-schnellsten Auftaugeschwindigkeit). Der prozentuale Zuwachs ist nun höher als derjenige der Progressivgeschwindigkeiten (mit einer Ausnahme bei 32,0°C/sec). Hierdurch wird die optimale Erwärmungsgeschwindigkeit von 24,7°C/sec deutlicher.

n = 2	Motilität		Geschwindigkeit	
	sofort	20 min	sofort	20 min
10 sec in 37°C	± 0	± 0	± 0	± 0
17 sec in 40°C $\bar{d}x$	-17,2	+ 9,8	+ 7,0	+ 2,4
Standardabw.	±27,4	±42,5	±15,5	±13,2
SEM	± 9,1	±14,2	± 5,2	± 4,4
14 sec in 45°C $\bar{d}x$	+13,1	+11,9	+ 7,7	+ 6,4
Standardabw.	±50,3	±36,7	± 9,6	±13,8
SEM	±16,8	±12,2	± 3,2	± 4,6
11 sec in 50°C $\bar{d}x$	+15,0	+16,7	+10,6	+ 9,8
Standardabw.	±42,1	±39,4	±12,6	±13,4
SEM	±14,0	±13,2	± 4,2	± 4,5
9 sec in 60°C $\bar{d}x$	- 9,9	+20,0	- 9,2	+14,4
Standardabw.	±22,8	±55,7	±13,4	±10,0
SEM	± 7,6	±18,6	± 5,1	± 3,3
7 sec in 70°C $\bar{d}x$	+25,5	+ 2,6	+11,6	+ 3,8
Standardabw.	±58,7	±36,5	±14,1	±14,3
SEM	±20,7	±12,9	± 5,0	± 5,0

Tab.8: Durchschnitte der prozentualen Einzelabweichungen

RELATIVE 20-MIN.-WERTE II

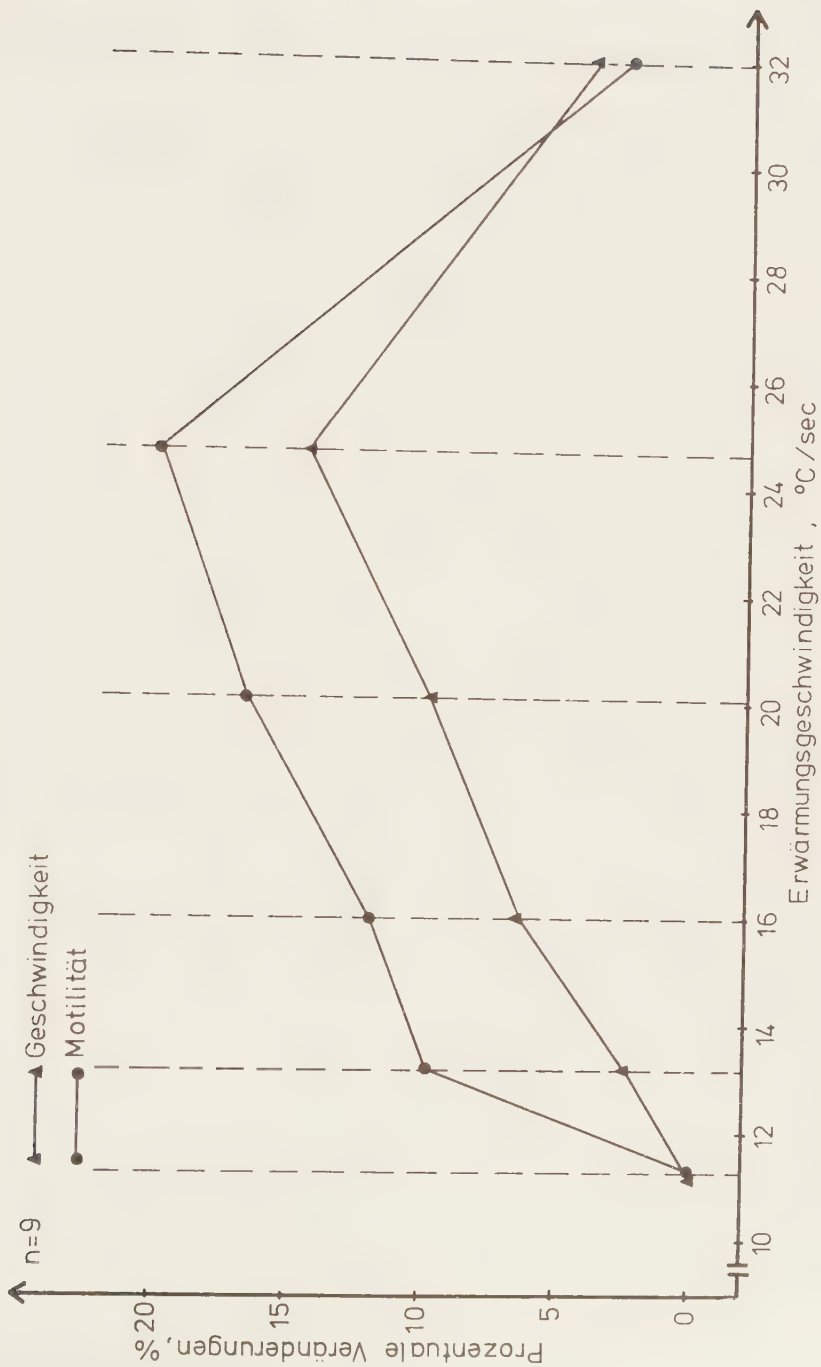


Abb.6: Durchschnitte der prozentualen Einzelabweichungen

3.4.3. Vergleich zwischen Nativ- und Kryosperma

Vergleicht man die Motilitätswerte des Nativspermas mit denen des Kryospermas, so fällt die Globalmotilität des Kryospermas besonders stark ab (siehe Abbildungen 3 und 4). Bei der geringsten Erwärmungsgeschwindigkeit beträgt der Unterschied bei der Sofortmessung durchschnittlich 24,5 Prozentpunkte (entspricht minus 55,4 %) und nach 20 min 28,5 Prozentpunkte (minus 64,3 %). Auch bei der beschriebenen optimalen Erwärmungsgeschwindigkeit von $24,7^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ verbessert sich der 20-Min.-Wert nur unwesentlich auf minus 27,2 Prozentpunkte (minus 61,5 %).

Bei der Progressivmotilität dagegen hält sich der Sprung vom Nativsperma zum Kryosperma ($11,3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) mit minus $3,0\ \mu\text{m}/\text{sec}$ (minus 7,2 %) sofort und minus $5,6\ \mu\text{m}/\text{sec}$ (minus 13,8 %) nach 20 min in engeren Grenzen. Die Sofortwerte liegen ab einer Erwärmungsgeschwindigkeit von $16,0^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ über dem Nativwert und nach 20 min ist immerhin das in 60°C für 9 sec erwärmte Kryosperma hinsichtlich der Progressivmotilität so gut wie das Nativsperma, indem es dessen Wert erreicht.

Die Qualitäten des verdünnten Nativspermas werden in keinem Fall erlangt.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Beeinflussung der Motilität von humanem Kryosperma bei unterschiedlichen Auftaugeschwindigkeiten zu untersuchen.

Das gewonnene Ergebnis einer besseren Auftaumotilität bei schnellerer Erwärmung der tiefgefrorenen Spermakonserven läßt sich auch anhand der theoretischen Erkenntnisse der Kryo-biologie betrachten.

Nach Luyet (32) nehmen folgende Faktoren Einfluß auf das Geschehen bei Gefrier- und Auftauvorgang:

I. Zelluläre Merkmale

1. Größe
2. Gestalt
3. Wassergehalt
4. Chemische Zusammensetzung
5. Eigenschaften der Membranen
6. Physikalische Struktur
7. Art der Aggregation

II. Von außen einwirkende Faktoren

1. Gefriertemperatur und -dauer
2. Gefrier- und Kühlgeschwindigkeiten
3. Protektive Substanzen
4. Konzentration der protektiven Substanzen
5. Erwärmungstemperatur
6. Erwärmungsgeschwindigkeit
7. Auftaugeschwindigkeit

III. Reaktionen auf das Gefrieren

1. Osmotische Dehydratation
2. Resistenz gegenüber intrazellulärem Gefrieren
3. Aufnahmefähigkeit für protektive Substanzen
4. Empfindlichkeit auf erhöhte Lösungskonzentrationen
5. Empfindlichkeit auf Lösungsverdünnung beim Tauen
6. Neigung zur Rekristallisation

Spermatozoen eignen sich von ihren biologischen Eigenschaften her gut zur Kryokonservierung: sie sind nicht an einen Gewebeverband gebunden, schwimmen frei in einem Suspensionsmedium, sind relativ klein und enthalten weniger Wasser als viele andere Zellen. Die Wasserdurchlässigkeit ihrer Membranen ist hoch. Diese Eigenschaften ermöglichen auch bei relativ schnellem Einfrieren noch eine genügende Dehydratation und Zellschrumpfung, wodurch die intrazelluläre Eisbildung weitgehend verhindert wird (45).

Der Gefriervorgang:

Die beim Gefriervorgang entstehenden Schäden lassen sich folgendermaßen darstellen:

Der Temperatur- oder Kälteschock tritt bei raschem Abkühlen von Zimmertemperatur (22°C) auf $+5^{\circ}\text{C}$ oder darunter auf. Während dadurch fast 90% aller Bullenspermatozoen getötet werden, zeigt sich der menschliche Samen wesentlich unempfindlicher (38). Auf molekularer Ebene gelten Schäden der Lipoproteinkomplexe in den Zellmembranen, Verlust von Lecithin aus der Plasmamembran und Verletzungen der Permeabilitätsbarrieren als Ursache (38). Diese Schäden können bei Temperaturwechseln in verschiedenen Zellkomponenten durch unterschiedliche Expansionskoeffizienten in den Membranen entstehen (43).

Bei weiterem langsamen Abkühlen unter 0°C bilden sich die ersten Eiskristalle extrazellulär. Das unterkühlte Wasser in der Zelle hat einen höheren Dampfdruck und mehr freie Energie als das Eis außerhalb. In der Folge diffundiert das intrazelluläre Wasser nach außen und gefriert dort. Diese Dehydration führt zu einer steigenden Konzentration der Lösung in der Zelle bei sinkendem Gefrierpunkt. Im Extremfall wird die Bildung intrazellulärer Eiskristalle bei nahezu völliger Dehydration und sehr hoher Viskosität des Protoplasmas unmöglich (31). Diese idealen Bedingungen werden umso leichter erreicht, je mehr Zeit zur Verfügung steht und je kleiner die Zelle, bzw. je größer das Verhältnis Zelloberfläche zu Zellvolumen ist. Ob für eine Zelle eine Geschwindigkeit "schnell" oder "langsam" ist, hängt also von deren Größe und Membrandurchlässigkeit für Wasser ab.

Sinkt dagegen die Temperatur schneller als die Dehydration erfolgen kann, kommt es zu intrazellulärer Kristallisation von Wasser. Dabei variiert die Gestalt der Kristalle mit der Temperatur und der Kühlgeschwindigkeit. Reines Wasser gefriert zwischen 0°C und -80 bis -100°C zu hexagonalen Kristallen. Beim Gefrieren zwischen -80 und -140°C bildet es kubische Kristalle und es vitrifiziert, d.h. wird amorphes Eis, wenn es sehr rasch unter -110°C gekühlt wird (31).

Die hohen Elektrolytkonzentrationen, die bei langsamer Kühlung extra- und intrazellulär auftreten, schädigen die Zelle durch pH-Verschiebungen und dadurch bedingte veränderte Reaktionskinetiken - z.B. kann die Beschleunigung einer Reaktion größer sein als deren Verlangsamung durch den Temperaturabfall -, durch Lösen von Lipiden aus Membranen und Veränderungen der Sekundär-

und Tertiärstrukturen von Makromolekülen. Die erfolgte Dehydratation bringt vorher durch Wassermoleküle getrennte Proteine in direkten Kontakt zueinander, neue Disulfidbrücken entstehen (15, 38).

Bei intrazellulärer Eisbildung sind vor allem die physikalischen Schäden der Zellstrukturen deletär. Deren Ausmaß hängt von der Größe der Eiskristalle ab, deren Wachstum wiederum von der zur Verfügung stehenden Zeit.

Anhand dieser Vorgänge lassen sich theoretisch vier Phasen in der Abhängigkeit der Überlebensrate der Zellen von der Gefriereschwindigkeit unterteilen:

- a) bei sehr langsamer Abkühlung schlechte Überlebensrate, da sehr lange Zeit für die beschriebenen chemischen Abläufe zur Verfügung steht,
- b) bei einer Kühlrate, die die Dehydratation noch eben ermöglicht, aber die Einwirkzeit der hohen Ionenkonzentration verkürzt, bessere Überlebensrate,
- c) bei schneller Kühlung, die zu intrazellulärer Eisbildung führt, aber noch genügend Zeit zum Kristallwachstum läßt, schlechte Überlebensrate, und
- d) bei ultraschnellem Kühlen und intrazellulärer Vitrifikation wiederum bessere Überlebenschancen (38).

In der Praxis haben Spermatozoen ohne Schutzkolloide bei schnellen Gefrierverfahren keine, bei langsamen Verfahren eine minimale (ca. 0,1 %) Überlebensrate. Dagegen haben Spermatozoen, die mit Kryoprotektiva versehen sind, eine Überlebensrate zwischen 5 % und 70 % (48, 68).

Glycerin als Hauptvertreter der kryoprotektiven Substanzen bindet Wasser, läßt Elektrolytkonzentrationen nicht so stark ansteigen, puffert, verringert Eiweißdenaturierungen und reduziert die extra- und intrazelluläre Eiskristallbildung. 1 Mol Glycerin bindet 3 Mol Wasser, wobei der Anteil des in der Zelle fest gebundenen Wassers von 10 % auf 25 % und mehr steigt (29). 10 % Glycerin in H_2O erniedrigen den Gefrierpunkt um $3^{\circ}C$, 20 % um $8^{\circ}C$ und 30 % um $14,5^{\circ}C$ (15). Die Wachstumsrate von Eiskristallen wird in Gegenwart von Glycerin stark gesenkt, die Kristalle wachsen feder- oder farnblattartig (69). Durch die Gefrierpunktserniedrigung und die verzögerte Kristallbildung werden die Erhöhung der Ionenkonzentration und die pH-Verschiebung ebenfalls verzögert. Doch schützt Glycerin, das im Austausch mit Wasser in die Zelle diffundiert, nur bei langsamer Kühlung gut, da andernfalls für die Dehydration nicht ausreichend Zeit bleibt, und intrazelluläre Eisbildung erfolgt (18).

Glycerin weist neben der kryoprotektiven auch eine toxische Wirkung auf. In höheren Konzentrationen führt es zu ultrastrukturellen Läsionen vor allem im Bereich des Akrosoms und der Plasmamembran (17). Ein Drittel des Motilitätsverlustes nach Kryokonser-vierung wird auf die Verdünnung mit kryoprotektivem Medium und zwei Drittel werden auf das Gefrieren selbst zurückgeführt (62). Das Verdünnermedium bewirkt zwar anfangs bei sinkender Motilität (von 77 % auf 65 %) eine Steigerung der Progressivgeschwindigkeit (von $57 \mu m/sec$ auf $67 \mu m/sec$), diese sinkt aber nach etwas über 2 Stunden unter den Vergleichswert in unbehandeltem Seminal-plasma (62). Die anfänglich stimulierende Wirkung des Verdünners

deckt sich mit der Beobachtung einer leichten Geschwindigkeitssteigerung in der vorliegenden Arbeit, wobei die prozentuale Motilität im Gesamtdurchschnitt gleich bleibt, bei den meisten Proben jedoch ebenfalls ansteigt (siehe S. 17).

Die Lipoprotein- und Lecithinfraktion des zugesetzten Eidotters hält den Lipidverlust der Membranen gering und erhöht so die Resistenz gegen den Kälteschock (23).

Der Auftauvorgang:

Dem Kristallisationsprozeß beim Kühlen entspricht eine während der Lagerung oder beim Erwärmen mögliche Rekristallisation. Man unterscheidet dabei den Übergang von amorphem zu kristallinem Eis, den Übergang von instabileren Kristallformen zur voll ausgebildeten hexagonalen Form und das Wachstum kleiner zu größeren Kristallen (31). Zur Rekristallisation kommt es während Lagerung oder Erwärmung bei Temperaturen über -50°C , aber selbst in Temperaturbereichen bis zu -130°C werden solche Phänomene noch beobachtet. Langsame Erwärmungsraten lassen Mikrokristalle auf zerstörerische Größe anwachsen (71). Kryoprotektive Substanzen schwächen diesen Vorgang ab, verhindern ihn aber nicht. Smith (69) beobachtete, daß sich die Eiskristalle in Anwesenheit von Glycerin beim Erwärmen ohne die sonst stattfindenden explosiven Effekte zurückbilden.

Ebenso wie in der typischen Temperaturkurve beim Kühlen entsprechend der während der Kristallisation frei werdenden Erstarrungswärme von 80 cal/g Eis ein Temperatursprung nach oben ("jump of latent heat") zu beobachten ist (69), weist die Temperaturkurve beim Erwärmen bei ca. -8°C ein Plateau auf.

Zur Umwandlung von der festen in die flüssige Phase wird Energie verbraucht, der Temperaturanstieg sistiert bis zum Abschluß des Tauvorganges (19, 20, 47). In beiden Fällen bringen hohe Kühl- bzw. Erwärmungsraten diese Unregelmäßigkeiten zum Verschwinden oder verkleinern sie. Während beim Gefrieren eine schnelle Passage dieser Temperaturzone vorgeschlagen wird, um das Kristallwachstum und somit dessen Schäden gering zu halten (59), liegt beim Auftauen die kritische Temperaturphase der Rekristallisation, die es schnell zu durchbrechen gilt, unter der des Plateaus (31).

Während der Erwärmung sind die Voraussetzungen zur Bildung großer Kristalle aus thermodynamischen Gründen günstiger als beim Gefrieren. Die maximale Wachstumsrate der Kristalle liegt in einem höheren Temperaturbereich als die maximale Bildungsrate von Kristallkeimen. Beim Erwärmen kann sich also zunächst eine ausreichende Anzahl von Kristallkeimen bilden und dann das Kristallwachstum optimal ablaufen (54). Auch andere Prozesse beim Erwärmen und Tauen laufen nur zum Teil genau in der umgekehrten Reihenfolge wie beim Gefrieren ab.

Als Folgen mechanischer Zellverletzungen durch Eis lassen sich nach Lozina - Losinskij (31) Rupturen, Perforationen, Kompression des Protoplasmas und die Trennung des Protoplasmas von den Zellmembranen vermuten. Dazu kommen die Schäden, die beim Wasserentzug durch die Eisbildung entstehen.

Beim Schmelzen weist die zuerst gebildete Flüssigkeit ebenfalls eine hohe Konzentration der gelösten Stoffe auf, zumal da die peripheren Anteile der Kristalle den höchsten Salzanteil auf-

weisen (31). Hier also nochmals Schäden durch hohe Ionenkonzentrationen und pH-Verschiebung.

Nicht nur der zeitliche Ablauf der Erwärmung ist fast immer anders als beim Gefrieren, auch physikalische und chemische Veränderungen beim Abkühlen und evtl. während der Lagerung können beim Erwärmen andere chemische Reaktionen nach sich ziehen. So benötigen viele physikalische und chemische Prozesse auf molekularer Ebene verschiedene Aktivationsenergien, die häufig für chemische Reaktionen höher liegen, so daß diese beim Abkühlen eher zum Stillstand kommen. Beim Erwärmungsvorgang kann aber eine chemische Reaktion evtl. schneller ablaufen als ein physikalischer Vorgang, reagieren z.B. zwei spezifische Gruppen auf getrennten Seitenketten eines Proteins miteinander, bevor eine Serie von Rotationen sie voneinander trennen kann (42).

Auch nach der Sulfhydryl-Theorie von Levitt (30) laufen Prozesse beim Tauen anders als beim Gefrieren ab. Nach der Theorie kommen in gefrorenen Zellen - bei extrazellulärer Kristallisation durch Dehydration und bei intrazellulärer Eisbildung zusätzlich durch den Druck der Eismassen - die Makromoleküle der Proteine in enge Nachbarschaft zueinander, wobei entweder durch die Oxidation zweier dann anstoßender SH-Gruppen zu einer SS-Bindung oder, wenn eine SH-Gruppe an eine intramolekulare SS-Bindung stößt, durch einen Wechsel der Bindung neue intermolekulare Disulfidbindungen entstehen. Solche Bindungen zwischen den Molekülen verursachen eine Denaturierung der Makromoleküle, wenn diese durch das beim Tauen freiwerdende und reabsorbierte Wasser wieder auseinandergedrängt werden. Die neuen intermolekularen

SS-Bindungen halten dabei fester als die nun gegen SS-Bindungen ausgetauschten intramolekularen SH-Bindungen. Auf diese Weise werden die Makromoleküle deformiert, geradezu entspiralisiert. Zur Stützung dieser Theorie hat Levitt im Protein aufgetauter Zellen mit Kryoschäden eine gegenüber solchen Zellen ohne Kryoschäden erhöhte Zahl von SS-Bindungen nachgewiesen.

Bei der Sulfhydryl-Theorie läßt sich die günstige Wirkung hoher Erwärmungsgeschwindigkeiten zum einen erneut mit der verminderten Rekrystallisation, zum anderen mit der Tatsache begründen, daß die Oberfläche der Eiskristalle der gefrorenen Systeme katalytischen Charakter hat und die chemischen Reaktionen bei ungefähr -10 bis -15°C im Vergleich zu höheren oder niedrigeren Temperaturen mehrfach beschleunigt, so daß der Faktor Zeit umso größere Bedeutung gewinnt (31). Und eben im Bereich zwischen -20 und 0°C treten beim Auftauen von Pailletten in verschiedenen Wasserbädern von 5°C bis 65°C die deutlichsten Unterschiede hervor. Bei 5°C Wasserbadtemperatur wird die Temperaturzone von -20 bis 0°C in 54,7 sec ($0,4^{\circ}\text{C}/\text{sec}$), bei 35°C in 8,1 sec ($2,5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) und bei 65°C in 2,9 sec ($7,0^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) durchschritten. Dagegen unterscheiden sich die Erwärmungsraten zwischen -196°C und -20°C kaum (50).

Ein anderer Faktor bei der Erwärmung ist die Rehydration. Die beim Gefrieren dehydrierte Zelle muß das beim Schmelzen extrazellulär freiwerdende Wasser wieder aufnehmen. In Abhängigkeit von der Erwärmungsgeschwindigkeit geschieht dies zum Teil während und zum Teil nach dem Auftauen. Das in die Zelle eingebrungene Glycerin verläßt die Zelle langsamer als das Wasser in

sie hineinströmt. In der Folge könnte die Zelle über ihr normales Volumen hinaus anschwellen und Schaden erleiden (18). Auch nach Mazur (39) kann eine beim Gefrieren osmotisch geschrumpfte Zelle während des Tauens nur eine bestimmte Oberflächenvergrößerung ohne Schaden tolerieren. Ungeklärt bleibt die Frage, ob für die Zelle eine schnelle oder langsame Rehydration an sich günstiger ist (31).

Den entscheidenden Faktor für das Überleben von Kryosperma stellt die Anwendung kryoprotektiver Substanzen dar. Glycerin macht die Geschwindigkeit des Kühlens und Erwärmens zweitrangig. Die Verletzlichkeit der Zellen wird jedoch nicht so sehr von der Kühlgeschwindigkeit als von der Erwärmungsgeschwindigkeit bestimmt (31). Diese Auffassung wird auch von anderen Autoren vertreten: die umfassenderen Veränderungen der Membranen wie Unterbrechung in ihrer Kontinuität, Bildung von Klümpchen und Myelinfiguren treten während oder nach der Tauphase auf (74); der eigentliche Schaden für die Zelle scheint eher während des Auftauens als während irgendeines der gezeigten oder postulierten Gefrierphänomene aufzutreten (43). Bei gefrierfixierten menschlichen Spermatozoen sind die akrosomalen Membranen unversehrt und die Mitochondrien im Mittelstück relativ normal, während bei den gefrorenen und wieder aufgetauten Spermatozoen das Plasmalemm des Akrosoms oft geriffelt, unterbrochen oder verschwunden, der akrosomale Inhalt ausgelaufen ist, und die Mitochondrien des Mittelstücks deutlich veränderte Cristae und eine vakuolisierte Matrix aufweisen (78). Auch diese Beobachtung legt nahe, daß sich die meisten ultrastrukturellen

Schäden während oder nach dem Erwärmen ereignen.

Die Umstände des Eingefrierens können jedoch Schäden beim Tauen vorprogrammieren. Wenn die Zellen langsam gekühlt werden, gibt es keine Notwendigkeit für rasches Erwärmen, wenn aber mit schnellem Kühlen intrazelluläre Eisbildung wahrscheinlicher wird, verhindert schnelles Tauen größeren Schaden (Rekristallisation) (31). Solange Samen relativ langsam in glycerinhaltigen Medien gefroren wurde, war es wenig augenscheinlich, daß die Auftaugeschwindigkeit ein kritischer Faktor ist. Heute jedoch wird Samen allgemein mit viel schnelleren Techniken, z.B. direkt im Dampf flüssigen Stickstoffs gefroren (45). Dazu paßt auch, daß bei Bullensperma die Gefriereschwindigkeit keinen Einfluß auf die Überlebensrate mehr hat, wenn es bei 75°C aufgetaut wird, jedoch bei niedrigeren Auftaugeschwindigkeiten von Bedeutung ist (3).

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besteht zwischen dem Glycerinspiegel und der Auftaugeschwindigkeit ein Zusammenhang. Bei Bullensperma steigt mit steigender Temperatur des Tauwasserbades auch der optimale Glycerinspiegel an, die minimale Schädigung trat bei 8,5 % Glycerin und 7,5 sec in 65°C ein (50). Rodriguez et al. (51) ermittelten, daß die verbesserte Motilität von in 55°C bis 90°C aufgetauten Proben generell unabhängig vom Glycerinspiegel ist, daß sich jedoch langsames Auftauen bei 5°C besonders verheerend in Verbindung mit höheren Glycerinmengen auswirkt. Dieser Zusammenhang unterstützt das Konzept von der Toxizität der kryoprotektiven Substanz (50).

Art und Auswirkung von Schäden:

Die durch die Kryokonservierung entstandenen Schäden kann man auf verschiedene Weise nachweisen: Bestimmung der Vitalität und Motilität der Spermatozoen, biochemische Parameter, das Sichtbarmachen morphologischer Veränderungen und schließlich die Anzahl der zum Erfolg führenden Inseminationen, die Fertilitätsrate. In dieser Arbeit wurden Global- und Progressivmotilität gemessen, da sie wesentliche Kriterien für die andrologische Diagnostik darstellen und sich mit Hilfe des MEP-Verfahrens objektivieren lassen. Die Wichtigkeit einer solchen objektiven Methode zeigt sich in der festgestellten Überbewertung der Globalmotilität bei der Schätzmethode um ca. 17 Prozentpunkte oder ca. 38 %, die mit Ergebnissen von Makler (33) gut übereinstimmt (Überschätzung von ca. 20 Prozentpunkten bzw. 57 %). Obwohl die meisten Untersucher die Motilität als primären Parameter gewählt haben, ist für menschliches Sperma im Gegensatz zu Rindersperma nicht nachgewiesen, daß sie am besten mit der Fertilität korreliert (62). Nach Behrman (9) und Carlborg (12) besteht keine sichere Korrelation zwischen Motilität nach dem Auftauen und nachfolgender Fertilität. Ein Verlust des Fertilisationsvermögens trotz zufriedenstellender verbleibender Motilität könnte mit einer stark verminderten Respiration und der Verschiebung des Stoffwechsels von Oxidation zu Glykolyse zusammenhängen (1, 2, 25). Der Motilitätsverlust könnte zumindest anfangs mehr Läsionen des Flagellarsystems als Störungen des Energiemetabolismus widerspiegeln (25). Jedoch wird die Motilität, besonders die Progression der Spermatozoen in der über-

wiegenden Mehrzahl der Fälle zum limitierenden Faktor (52, 56). Man kann wohl sagen, daß Fertilität Motilität benötigt, doch Motilität Fertilität nicht sichert (70).

Schädigungen des Spermatozoenstoffwechsels lassen sich eruieren, indem man die umgesetzten Stoffe selbst mißt oder die Aktivität beteiligter Enzyme. So sind eine verminderte Fructolyse bei Humankryosperma (58) und eine verminderte Glucoseaufnahme bei Kryosperma vom Schafbock (75) bekannt. Auch der Sauerstoffverbrauch ist nach dem Auftauen geringer (9). Sofort nach dem Tauen zeigt sich ein geringfügiger Motilitätsvorteil mit schnellen Auftauverfahren (unter fließendem Wasser und im Wasserbad von 37°C) und nach 4 Stunden eine etwas bessere Motilität und ein höherer O₂-Verbrauch mit langsamen Methoden (im Alkoholbad von 5°C und in Luft bei Zimmertemperatur) (9). Wegen des anderen Temperaturbereiches und anderer Verpackungsart sind diese Ergebnisse jedoch nicht mit den hier ermittelten Ergebnissen zu vergleichen. Die Korrelation von O₂-Verbrauch mit Motilität gibt auch Guerin (25) an, dessen Ergebnisse zeigen, daß Motilität, Respiration und die Aktivität von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase nach dem Auftauen zu im wesentlichen gleichen Prozentsätzen reduziert sind, wenn man die Mittelwerte sämtlicher Proben betrachtet, diese Parameter aber bei einem einzelnen Ejakulat selten in gleichem Maß verändert sind, da die auftretenden Schäden nicht von einem einzigen Mechanismus abhängen.

Auf der Ebene der Enzyme kommen mehrere Schädigungsmöglichkeiten in Betracht. Eine gesteigerte Aktivität wird gemessen, wenn Enzyme aus zerstörten Strukturen freigesetzt werden, d.h. sich entweder

von intrazellulären Membranen loslösen oder aus der Zelle auslaufen, wogegen bei einer Kryoschädigung des Enzyms selbst die Aktivität vermindert ist (24, 31). Bestimmte Enzyme werden in bestimmten Temperaturbereichen am meisten denaturiert, z.B. Katalase zwischen -30°C und -78°C (13). Die Enzyminaktivierung kann auf Dissoziation in Untereinheiten und ausbleibender oder fehlerhafter Reassoziaton und Hybridbildung, z.B. bei LDH und TPH, beruhen, die als Folgen der schon besprochenen Dehydratation durch schnelles Auftauen vermindert werden können (13). Die Bildung intramolekularer Bindungen kann eine volle Entfaltung eines Enzyms und somit die Exposition seines aktiven Zentrums verhindern (15). Wenn sich die Aktivität eines einzigen Enzyms verändert, kann ein ganzes Enzymsystem in seiner Synchronität erheblich beeinträchtigt sein (31).

Von besonderer Bedeutung für die Qualität von Kryosperma ist die Unversehrtheit des Akrosoms. Akrosomenkappenschäden, Verlust des vorderen Akrosomensegments bei Erhalt der inneren Akrosomenmembran, Auslaufen des akrosomalen Inhalts und Abfall der Akrosinaktivität sind von Schill und Wolff (57) beschrieben. Die meisten strukturellen Veränderungen bei aufgetauten Spermatozoen mit Glycerinzusatz treten am Akrosom mit folgenden nach Häufigkeit geordneten Phänomenen auf: unterschiedliche Dichte, Wellung der inneren Membran, aufgehobene Parallelität der Begrenzungen, Vergrößerung, Vesikelbildung, Wellung der äußeren Membran, niedrige Dichte, Zerstörung (17). Wie schon in der Einleitung dargelegt, wurde bei Bullensperma der Prozentsatz intakter Akrosomen mit schnellen Auftaumethoden angehoben, nach Wiggin und

Almquist (77) um 5,5 % pro Steigerung der Temperatur des Tauwasserbades um 20°C. Eine solche Untersuchung mit Humansperma ist mir nicht bekannt, ein ähnlicher Sachverhalt liegt jedoch nahe.

Trotz all dieser Erkenntnisse und Theorien gilt auch für die vorliegende Arbeit der Satz von Stowell et al. (71), daß wir die genauen Einflußgrößen vieler möglicher Faktoren und deren Relation zueinander nicht verstehen, die erklären könnten, warum wenige Sekunden oder Minuten Auftauzeit die Eigenschaften von Zellen verändern.

Eigene Methodik und Ergebnisse:

Die Methoden dieser Arbeit entsprechen Verpackungsmittel, Verdünnermedium und Gefrierverfahren betreffend den an der Klinik eingeführten Vorgehen, bezüglich Motilitätsbestimmung und Auftauverfahren den in Kap. 2 beschriebenen Methoden. Die verwendeten 0,25 ml-Plastikpailletten sind gut handzuhaben, ermöglichen auch bei geringen Ejakulatmengen eine noch ausreichende Aufteilung der Probe und lassen wegen ihres großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen eine rasche und gleichmäßige Temperaturverteilung zu. Im Vergleich zu 0,5 ml-Plastikpailletten besteht kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate bei Auftauen in Zimmertemperatur (16). Allerdings kann man die Auftaubedingungen und -ergebnisse grundsätzlich nicht auf andere Verpackungsmittel wie z.B. Glasampullen übertragen, da sich dafür bei sonst gleichen Bedingungen verschiedene Temperaturkurven ergeben (10). Während der Versuche kam es wenige Male bei einer Wasserbadtemperatur von 60°C und etwas häufiger bei einer

von 70°C zur Explosion der tiefgefrorenen Pailletten unmittelbar nach dem Eintauchen. Dies ist möglicherweise auf eingedrungenen flüssigen Stickstoff zurückzuführen, der plötzlich in die Dampfphase übergeht (10).

Die Abkühlrate für Pailletten in Stickstoffdampf beträgt 16 - 25 °C/min (68), jedoch variieren die Temperaturkurven innerhalb eines Gefriervorganges von Paillette zu Paillette und besonders von Gefriervorgang zu Gefriervorgang sehr, da N₂-Dampf eine niedrige Wärmekapazität hat, also von einer geringen Wärmemenge stark erwärmt wird. Zudem verhindert seine geringe thermische Leitfähigkeit raschen und effizienten Wärmetransport und eine gleichmäßige Temperatur in der gesamten Gefrierkammer (23). Doch führt dieses Gefrierverfahren zu deutlicher extrazellulärer und nur minimaler intrazellulärer Kristallisation (65). Die Glycerinkonzentration im verdünnten Sperma beträgt in vorliegender Arbeit 7,5 %. Bei Veränderungen der Gefriermethode und besonders der Art und Menge der Kryoprotektiva ändern sich die optimalen Auftaubedingungen wahrscheinlich ebenfalls.

Die Beschränkung der Erwärmungsgeschwindigkeiten auf den untersuchten Bereich bei Wasserbadtemperaturen von 37°C bis 70°C ist in der Begrenztheit der zur Verfügung stehenden Samenmenge pro Probe begründet. Ein größerer Temperaturbereich hätte die Herausarbeitung eines linearen Zusammenhangs zwischen Erwärmungsgeschwindigkeit und Motilität in Frage gestellt und evtl. nur noch punktuelle Aussagen zugelassen. Auch der hohe Zeitaufwand für die photographische Motilitätsbestimmung hätte einen wesentlich größeren Umfang der Arbeit verhindert. Vertretbar erscheint die-

se Eingrenzung angesichts der sich auf diesen Temperaturbereich schneller Auftaugeschwindigkeiten beziehenden veterinärmedizinischen Erfahrungen und deren Abstützung durch kryobiologische Erkenntnisse. Meines Wissens werden in der Andrologie sehr langsame Verfahren, z.B. bei 5°C , nicht mehr angewandt.

Der Abbruch des Erwärmungsvorganges im Wasserbad bei Erreichen einer Temperatur von durchschnittlich $27,7^{\circ}\text{C}$ beruht auf zwei Zielen. Einerseits soll - Schutzmaßnahmen gegen einen eventuellen Kälteschock vorausgesetzt - eine der Körperwärme nahe Temperatur erlangt werden, andererseits soll eine Überhitzung des Samens weitgehendst ausgeschlossen sein. ✓

Für Rindersperma wird sofortige Erwärmung bis hin zur Körpertemperatur empfohlen (5, 11). Allerdings müssen Vorkehrungen gegen einen Kälteschock bei Berührung mit der Umgebungstemperatur getroffen werden (11, 51). Vorherige Unterbrechung bei 0°C und noch nicht beendetem Tauvorgang bewirkt sofortige Akrosomenschäden, bei 0°C und abgeschlossenem Tauen einen Kälteschock, bei 10°C latente nach 4 Stunden manifest werdende Schäden und erst bei 20°C keinen Motilitätsverlust oder Schaden am Akrosom (11). Aufgetaute Spermatozoen erleiden Schaden, wenn sie plötzlichen Temperaturveränderungen gleich welcher Richtung ausgesetzt werden, wobei langsame Auftauraten die Wahrscheinlichkeit eines Schadens bei plötzlicher Erwärmung erhöhen (61). Nur nach De Abreu et al. (14) schädigen sowohl eine sofortige als auch eine verzögerte Erwärmung über 5°C hinaus die Spermatozoen unabhängig von der Auftaurate und der Erwärmungsrate danach. Eine solche Erwärmung findet jedoch spätestens nach der Insemination statt, ist also unvermeidbar.

Bei einer Erwärmung auf rund 28°C und einer sofortigen Überführung in auf 37°C vorgewärmte Plastikgefäße ist kein Kälte- oder Wärmeschock zu befürchten, zumal Humansperma dafür weniger empfänglich ist. Um eine versehentliche schädliche Überwärmung zu verhindern, wird auf eine Endtemperatur im Wasserbad von 37°C verzichtet. Somit beträgt der Sicherheitsabstand auch bei einer Wasserbadtemperatur von 70°C noch ca. 4 sec (siehe Tab. 2). Allerdings muß darauf geachtet werden, daß die Paillette nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff sofort ins Auftaubad kommt und sich nicht zwischenzeitlich schon erwärmt und im Wasserbad dann eine höhere Temperatur in kürzerer Zeit erreicht (51).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß von den vorgegebenen Auftauvariationen eine 9 sec lange Erwärmung im 60°C heißen Wasserbad, entsprechend einer Erwärmungsrate von durchschnittlich $24,7^{\circ}\text{C}/\text{sec}$, die besten Resultate ergibt. Nach 20 min Inkubation bei 37°C bilden sowohl die absoluten Werte von Motilität und Progressivgeschwindigkeit dieser Variante (Abb. 3 und 4) als auch deren Durchschnitte der prozentualen Einzelabweichungen (Abb. 6) den Höhepunkt der jeweiligen Kurve. Hervorzuheben ist auch der gleichmäßige Anstieg der Werte mit steigender Erwärmungsgeschwindigkeit bis zu diesem Optimum. Die sofort nach der Erwärmung ermittelten Werte zeigen dagegen keinen so eindeutigen Verlauf zugunsten einer bestimmten Auftaubedingung, jedoch insgesamt ebenfalls die günstige Wirkung höherer Auftautemperaturen. Wahrscheinlich kann sich so kurz nach dem Auftauen noch kein Gleichgewicht in Stoffwechsel und Funktion der Sperma-

tozoen eingestellt haben. Die Steigerung der absoluten Werte von Motilität (20-min-Werte der Überlebensrate: 42,4 % bei 37°C zu 45,0 % bei 60°C) und Progressivgeschwindigkeit (36,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ zu 41,2 $\mu\text{m}/\text{sec}$) erscheint zwar nicht sehr groß, jedoch waren bei der sonst schon ausgefeilten Methodik keine spektakulären Verbesserungen mehr zu erwarten.

Daß die Überlebensrate in unseren Untersuchungen unter der in der Literatur (8, 44, 66, 68) angegebenen von durchschnittlich 70 % liegt, könnte an der Verwendung von Ejakulaten von Patienten und deren herabgesetzter Gefrierfähigkeit liegen (58). Beck und Silverstein (7) geben niedrigere Überlebensraten an, nämlich 34 % bei einer Dichte von 20 - 50 Mill/ml, 37 % bei 51 - 100 Mill/ml und 49 % bei mehr als 100 Mill/ml. Daß nach dem Auftauen die prozentuale Motilität stark und die Geschwindigkeit der Spermatozoen vergleichsweise gering abfällt, steht mit Beobachtungen von Serres et al. (62) in Einklang.

Weiteren Untersuchungen muß vorbehalten bleiben, zu überprüfen, ob die günstige Wirkung schnellen Auftauens auch nach einer längeren Inkubationszeit noch anhält, und ob sich mit Kallikrein, das auch bei Kryosperma die Motilität steigert (46, 58), weitere Verbesserungen erreichen lassen. Solche und umfangreichere Untersuchungen werden mit Hilfe der "Laser-Doppler-Spektrophotometrie" leichter durchzuführen sein.

Abschließend läßt sich sagen, daß sich die tiermedizinischen und kryobiologischen Erkenntnisse hiermit auch für die Humanandrologie bestätigt haben. Für die Praxis kann empfohlen werden, Samen in 0,25 ml - Minitüb im Wasserbad von 60°C 9 sec lang zu erwärmen.

Die Insemination sollte möglichst bald danach erfolgen, da Motilitätsverluste bei Kryosperma schneller als bei Nativsperma eintreten (23, 27, 62). Eine endgültige Bestätigung einer Verbesserung der Kryospermaqualität durch Anwendung einer schnelleren Auftaurate müßte durch eine gesteigerte Fertilitätsrate erfolgen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Multiple-Exposure-Photographie nach Makler die Global- und Progressivmotilität menschlichen Kryospermas nach verschiedenen Auftaugeschwindigkeiten untersucht.

Nach Ermittlung geeigneter Auftaumodalitäten wurden die photographischen Motilitätsbestimmungen beim Nativsperma, nach Zusatz von Verdünnermedium und nach dem Auftauen in sechs verschiedenen Wasserbadtemperaturen vorgenommen.

Im Vergleich zu einer bisher von uns verwendeten Erwärmungsrate bei einer Auftautemperatur von 37°C war bei 60°C Auftautemperatur nach 20 Minuten eine signifikante Zunahme der Progressivgeschwindigkeit um rund $5\text{ }\mu\text{m/sec}$, d.h. durchschnittlich um 14 % zu verzeichnen. Der unter diesen Bedingungen erzielte Zuwachs der Globalmotilität ist statistisch nicht signifikant. Progressiv- und Globalmotilität steigen mit zunehmender Erwärmungsrate stetig bis zu ihrem Höchstwert bei 60°C Auftautemperatur an und fallen bei noch schnellerem Auftauen wieder ab.

Als Ergebnis unserer Untersuchungen kann daher zur Optimierung der Qualität von Kryosperma, das in Plastikröhrchen (0,25 ml) gelagert wird, eine Erwärmungsrate von ca. 25°C/sec , entsprechend einer Inkubationszeit von 9 sec in 60°C heißem Wasser, empfohlen werden.

Das von uns gefundene Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen aus Kryobiologie und Tiermedizin und wird anhand der zur Verfügung stehenden Literatur diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1. ACKERMAN, D.R.
Fructose utilization of human spermatozoa after cooling and freezing
Int. J. Fertil. 12, 1-4 (1967)
2. ACKERMAN, D.R.
Effect of cooling and freezing on the aerobic and anaerobic lactic acid production of human semen
Fertil. Steril. 19, 123-128 (1968)
3. ALMQUIST, J.O.
A comparison of penicillin, streptomycin, and sulfanilamide for improving the fertility of semen from bulls of low fertility
J. Dairy Sci. 34(8), 819-822 (1951)
4. ALMQUIST, J.O. and WIGGIN, H.B.
Effect of different combinations of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in U.S. plastic straws
A. I. Digest 21(9), 10-11 (1973)
5. ALMQUIST, J.O., ROSENBERGER, J.L. and BRANAS, R.J.
Effect of thawing time in warm water on fertility of bovine spermatozoa in plastic straws
J. Dairy Sci. 62, 772-775 (1979)
6. ASHWOOD-SMITH, M.J.
Blood and bone marrow preservation
In: Cryobiology. A conference sponsored by the American Cancer Society
Stowell, R.E. (ed.), 299-301
Washington (1965)
7. BECK, W.W. and SILVERSTEIN, I.
Variable motility recovery of spermatozoa following freeze preservation
Fertil. Steril. 26, 863-867 (1975)

8. BEHRMAN, S.J. and ACKERMAN, D.R.
Freeze preservation of human semen
Amer. J. Obstet. Gynec. 103, 654-664 (1969)
9. BEHRMAN, S.J.
Preservation of human sperm by liquid nitrogen vapor freezing
In: Current problems in fertility
Ingelman-Sundberg, A. and Lunell, N.-O. (eds.), 10-16
New York - London (1971)
10. BERNDTSON, W.E. and PICKETT, B.W.
Techniques for the cryopreservation and field handling of bovine spermatozoa
In: The integrity of frozen spermatozoa
Nat. Academy of Sciences (ed.), 53-77
Washington (1978)
11. BROWN, J.L., SENGEL, P.L. and HILLERS, J.K.
Influence of thawing time and post-thaw temperature on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in .5-ml French straws
J. Anim. Sci. 54, 938-944 (1982)
12. CARLBORG, L.
Some problems involved in freezing and insemination with human sperm
In: Current problems in fertility
Ingelman-Sundberg, A. and Lunell, N.-O. (eds.), 23-27
New York - London (1971)
13. CHILSON, O.P., COSTELLO, L.A. and KAPLAN, N.O.
Effect of freezing on enzymes
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 55-65
Washington (1965)
14. DE ABREU, R.M., BERNDTSON, W.E., SMITH, R.L. and PICKETT, B.W.
Effect of post-thaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in French straws
J. Dairy Sci. 62, 1449-1454 (1979)

15. DOUZON, P.
Cryobiochemistry. An introduction
London (1977)
16. EMPERAIRE, J.-C. and CZYGLIK, F.
Semen freezing in 0,5 and 0,25 ml straws
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 161-166
New York - London (1980)
17. ESCALIER, D. and BISSON, J.-P.
Quantitative ultrastructural modifications in human spermatozoa after freezing
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 107-122
New York - London (1980)
18. FARRANT, J.
General principles of cell separation
In: Frozen human semen
Richardson, D.W. et al. (eds.), 6-10 (1980)
19. FRIBERG, J. and NILSSON, O.
Motility and morphology of human sperms after freezing in liquid nitrogen
In: Current problems in fertility
Ingelman-Sundberg, A. and Lunell, N.-O. (eds.), 17-22
New York - London (1971)
20. FRIBERG, J.
Survival of human spermatozoa after freezing with different techniques
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 167-174
New York - London (1980)
21. FRIEDMAN, S.
Artificial insemination with frozen human semen: 227 cases
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 223-230
New York - London (1980)

22. GIGON, U. and HALDEMAN, R.
Results of heterologous insemination at the University of
Berne Gynecology Clinic
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 267-272
New York - London (1980)
23. GRAHAM, E.F.
Fundaments of the preservation of spermatozoa
In: The integrity of frozen spermatozoa
Nat. Academy of Sciences (ed.), 4-44
Washington (1978)
24. GRAHAM, E.F. and CRABO, B.G.
Some methods of freezing and evaluating human spermatozoa
In: The integrity of frozen spermatozoa
Nat. Academy of Sciences (ed.), 274-304
Washington (1978)
25. GUERIN, J.-F., MENEZO, Y. and CZYBA, J.-C.
Biochemical modifications of frozen semen
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 139-146
New York - London (1980)
26. HARRISON, R.F. and SHEPPARD, B.L.
Comparison of cryoprotection techniques: a light and elec-
tron microscopy study
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 123-130
New York - London (1980)
27. KATZORKE, T., PROPPING, D. and TAUBER, P.F.
Results of donor artificial insemination (AID) in 415 coup-
les
Int. J. Fert. 26, 260-266 (1981)

28. LEBECH, P.E. and DETLEFSEN, G.
Artificial insemination with frozen spermatozoa: results
from 1967 to 1978
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 249-257
New York - London (1980)
29. LEHMANN, H.
Changes in enzymes at low temperatures
In: Cryobiology. A Conference...
Stowell, R.E. (ed.), 66-69
Washington (1965)
30. LEVITT, J.
The role of SH and SS in the resistance of cells to high and
low temperatures
In: The cell and environmental temperature
Troshin, A.S. (ed.), 269-274
Pergamon Press (1967)
31. LOZINA-LOSINSKIJ, L.K.
Studies in cryobiology. Adaption and resistance of organisms
and cells to low and ultralow temperatures
New York - Toronto (1974)
32. LUYET, B.J.
Attempt at correlating some of the extant data on low tempe-
rature preservation of various cells
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 315-322
Washington (1965)
33. MAKLER, A.
A new multiple exposure photography method for objective hu-
man spermatozoal motility determination
Fertil. Steril. 30, 192-199 (1978)
34. MAKLER, A.
A new chamber for rapid sperm count and motility evaluation
Fertil. Steril. 30, 313-318 (1978)

35. MAKLER, A.
The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count
and motility evaluation
Fertil. Steril. 33, 337-338 (1980)
36. MAKLER, A. and BLUMENFELD, Z.
Optimum measurement time for human sperm velocity determination
Archives of Andrology 5, 189-194 (1980)
37. MATHESON, G.W., CARLBORG, L. and GEMZELL, C.
Frozen human semen for artificial insemination
Amer. J. Obstet. Gynec. 104, 495-501 (1969)
38. MAZUR, P.
Causes of injury in frozen and thawed cells
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 175-182
Washington (1965)
39. MAZUR, P. and RIGOPOULOS, N.
Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration
to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate
Cryobiology 20(3), 274-289 (1983)
40. MEDAWAR, P.B. and BILLINGHAM, R.E.
The viability of mammalian skin after freezing and thawing
In: Freezing and drying
Report of the Int. Symposium of freezing and drying
Harrins, R.J.C. (ed.), 55-62
Springfield/Ill. (1951)
41. MILLET, D. and JONDET, M.
Artificial insemination with frozen donor semen: results in
604 women
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 259-266
New York - London (1980)

42. MULLHAUPT, J.T.
Molecular factors affecting gametic integrity during storage
at low temperature
In: The integrity of frozen spermatozoa
Nat. Academy of Sciences (ed.), 126-143
Washington (1978)
43. PENNELL, R.B.
Low-temperature preservation of protein
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 269-272
Washington (1965)
44. PERLOFF, W., STEINBERGER, E. and SHERMAN, J.K.
Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor
technic
Fertil. Steril. 15, 501-504 (1964)
45. POLGE, C.
Principles and practice of freezing animal semen
In: Frozen human semen
Richardson, D.W. et al. (eds.), 18-32 (1980)
46. PREISSLER, G.
Beeinflussung der Spermatozoenpenetration durch Komponenten
des Kallikrein-Kinin-Systems
Med. Diss., München (1979)
47. READ, M.D.
The relationship between methods of freezing human semen and
successful A.I.D.
In: Frozen human semen
Richardson, D.W. et al. (eds.), 89-102 (1980)
48. RICHARDSON, D.W.
Factors influencing the fertility of frozen semen
In: Frozen human semen
Richardson, D.W. et al. (eds.), 33-54 (1980)
49. ROBBINS, R.K., GERBER, L.E. and SAACKE, R.G.
Influence of thaw rate on maintenance of the acrosomal cap
J. Anim. Sci. 35, 253 (1972)

50. ROBBINS, R.K., SAACKE, R.G. and CHANDLER, P.T.
Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws.
J. Anim. Sci. 42, 145-154 (1976)
51. RODRIGUEZ, O.L., BERNDTSON, W.E., ENNEN, B.D. and PICKETT, B.W.
Effect of rate of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws
J. Anim. Sci. 41, 129-136 (1975)
52. SANTOMAURO, A.G., SCIARRA, J.J. and VARMA, A.O.
A clinical investigation of the role of the semen analysis and postcoital test in the evaluation of male infertility
Fertil. Steril. 23, 245-251 (1972)
53. SAWADA, Y., ACKERMAN, D.R. and BEHRMAN, S.J.
Motility and respiration of human spermatozoa after cooling to various low temperatures
Fertil. Steril. 18, 775-781 (1967)
54. SCHEIWE, M.W. and KÖRBER, C.
Basic investigations on the freezing of human lymphocytes
Cryobiology 20(3), 257-273 (1983)
55. SCHERER, W.F.
Practical application and problems of low-temperature preservation technics for cultural animal cells
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 304-305
Washington (1965)
56. SCHILL, W.-B.
Humane Spermakonservierung und therapeutische Ausblicke
Der Hautarzt 23, 525-530 (1972)
57. SCHILL, W.-B. and WOLFF, H.
Ultrastructure of human sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen preservation
Int. J. Fertil. 19, 217-223 (1974)

58. SCHILL, W.-B., PRITSCH, W. and PREISLER, G.
Effect of caffeine and kallikrein on cryo-preserved human
spermatozoa
Int. J. Fertil. 24(1), 27-32 (1979)
59. SCHNIEDEN, H.
The evaluation of cryoprotective media for human semen
In: Frozen human semen
Richardson, D.W. et al. (eds.), 59-88 (1980)
60. SCHOYSMAN-DEBOECK, A. and SCHOYSMAN, R.
Clinical comparison of fresh and frozen semen
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 295-300
New York - London (1980)
61. SENGGER, P.L., BECKER, W.C. and HILLERS, J.K.
Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility
and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic
straws
J. Anim. Sci. 42, 932-936 (1976)
62. SERRES, C., JOUANNET, P., CZYGLIK, F. and DAVID, G.
Effects of freezing on spermatozoa motility
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 147-160
New York - London (1980)
63. SHERMAN, J.K. and BUNGE, R.G.
Observation on preservation of human spermatozoa at low tem-
peratures
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82, 686-688 (1953)
64. SHERMAN, J.K.
Preservation of bull and human spermatozoa by freezing in
liquid nitrogen vapor
Nature 194, 1291-1292 (1962)
65. SHERMAN, J.K.
Improved methods of preservation of human spermatozoa by
freezing and freeze-drying
Fertil. Steril. 14, 49-64 (1963)

66. SHERMAN, J.K.
Practical applications and technical problems of preserving spermatozoa by freezing
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 288-296
Washington (1965)
67. SHERMAN, J.K.
Historical synopsis of human semen cryobanking
In: Human artificial insemination and semen preservation
David, G. and Price, W.S. (eds.), 95-105
New York - London (1980)
68. SHERMAN, J.K.
Cryobiological principles and application of cryopreserved human spermatozoa
Vortrag auf dem Symposium "Spermakonservierung und instrumentelle Insemination" am 3.12.1983 in München
nicht publ. (1983)
69. SMITH, A.U.
Biological effects of freezing and supercooling
London (1961)
70. SMITH, K.D., STULTZ, D.R. and STEINBERGER, E.
Effects of long-term storage of human spermatozoa in liquid nitrogen
In: Aging gametes. Int. Symp. in Seattle 1973, 265-277
Basel (1975)
71. STOWELL, R.E., YOUNG, D.E., ARNOLD, E.A. and TRUMP, B.F.
Structural, chemical, physical, and functional alterations in mammalian nucleus following different conditions of freezing, storage and thawing
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 115-143
Washington (1965)
72. TRELFOED, J.D. and MUELLER, F.
Observations and studies on the storage of human sperm
Can. Med. Ass. J. 100, 62-65 (1969)

73. TROUNSON, A.O., MAHADEVAN, M., WOOD, J. and LEETON, J.F.
Studies on the deep-freezing and artificial insemination
of human semen
In: Frozen human semen
Richardson, D.W. et al. (eds.), 173-185 (1980)
74. TRUMP, B.E., YOUNG, D.E., ARNOLD, E.A. and STOWELL, R.E.
Effects of freezing and thawing on the structure, chemical
constitution and function of cytoplasmatic structures
In: Cryobiology. A conference...
Stowell, R.E. (ed.), 144-168
Washington (1965)
75. VOGLMAYR, J.K., CHARTIER, D.M. and SAWYER, R.F. JR.
Viability of ram testicular spermatozoa following cryopre-
servation in rete testis fluid
Cryobiology 20(4), 421-431 (1983)
76. WIGGIN, H.B. and ALMQUIST, J.O.
Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration ti-
me and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in
plastic straws
J. Dairy Sci. 58, 416-419 (1975)
77. WIGGIN, H.B. and ALMQUIST, J.O.
Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon
acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa fro-
zen in plastic straws
J. Anim. Sci. 40, 302-305 (1975)
78. WOOLLEY, D.M. and RICHARDSON, D.W.
Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing
and thawing
J. Reprod. Fert. 53, 389-394 (1978)

Herrn Professor Dr. med. W.-B. Schill wird für die Überlassung des Themas der Arbeit und für die Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit gedankt.

Mein Dank gilt außerdem den medizinisch-technischen Assistentinnen des andrologischen Labors an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München, die mich in allen technischen Fragen mit Rat und Tat unterstützten. Insbesondere möchte ich Frau M. Feifel herzlich für ihre Hilfe danken.

Schließlich danke ich meinem Vater, Herrn Franz Rübekeil, für seine fachmännische Hilfe beim Bau des mechanischen Stroboskops.

Lebenslauf

Am 27. November 1956 wurde ich als erstes Kind des Mechanikermeisters Franz Rübekeil und der Kinderkrankenschwester Angelika Rübekeil, geb. Goldberg, in München geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich das neusprachliche Thomas-Mann-Gymnasium in München, an dem ich im Sommer 1976 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach erfolgreichem Ablegen der Ärztlichen Prüfung wurde mir am 30.6.1983 die Approbation als Arzt erteilt. Danach war ich mit der Durchführung der vorliegenden Promotionsarbeit beschäftigt.

Seit 6. Februar 1984 bin ich als wehrpflichtiger Stabsarzt bei der Bundeswehr tätig.

